

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**PAPEL DE GADD45B Y P38 EN EL DESARROLLO TÍMICO Y
LA FUNCIÓN DE CÉLULAS T CD4 DE RATÓN**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María Salvador Bernáldez

Bajo la dirección del doctor

Jesús M Salvador Sánchez

Madrid, 2012

A mi Familia



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Papel de Gadd45b y p38 en el desarrollo tímico y la función de células T CD4 de ratón

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por
María Salvador Bernáldez

Bajo la dirección del Dr.
Jesús M. Salvador Sánchez

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	13
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	25
1. Propiedades generales de la respuesta inmunológica	27
2. Linfocitos T	28
2.1. Activación de los linfocitos T CD4 ⁺	28
2.2. Función efectora de las células T CD4 ⁺ . Células T _{h1} y T _{h2}	29
2.3. Señalización del TCR	31
2.4. Desarrollo de los linfocitos T en el Timo	33
2.5. Selección tímica	34
3. Función de Gadd45b en la respuesta inmunológica	35
3.1. La familia Gadd45	35
3.2. Estructura y función biológica de las proteínas Gadd45	36
3.3. Papel de Gadd45b en la función de los linfocitos T	38
3.4. Regulación de la función de las MAPKs	39
4. Papel de la familia p38 en la respuesta inmunológica	42
4.1. La familia p38	42
4.2. Ruta de señalización de p38 en las células T	43
4.3. Papel de p38 en la función de los linfocitos T CD4 ⁺	45
4.4. Aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de p38	44
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Modelos murinos	55
1.1. Ratones deficientes en Gadd45b	55
1.2. Ratones deficientes en p38 α y p38 β	55

Índice

1.3. Extracción de ADN y genotipaje de los ratones	56
2. Análisis por citometría de flujo	59
2.1. Estudio del fenotipo inmunológico	59
2.2. Estudio por citometría de flujo de las células T _{reg}	60
3. Cultivos celulares y ensayos funcionales	60
3.1. Aislamiento y cultivo de células T CD4 ⁺	60
3.2. Ensayos de proliferación	60
3.3. Ensayos de muerte celular	61
3.4. Diferenciación de células T CD4 ⁺ hacia T _{h1} y T _{h2} y ensayo de producción de citoquinas	62
3.5. Activación <i>in vitro</i> de timocitos	63
3.6. Activación <i>in vivo</i> de timocitos	63
4. Análisis de auto-anticuerpos por ELISA	64
5. Histopatología e inmunohistoquímica	64
6. Preparación y análisis de proteínas por wb	65
6.1. Preparación de extractos celulares totales	65
6.2. Análisis de proteínas por wb	65
7. Inmunoprecipitación y ensayo de actividad quinasa	68
8. Análisis estadístico	68
RESULTADOS	71
1. Los ratones deficientes en Gadd45b desarrollan una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematoso sistémico	73
2. Gadd45b controla la homeostasis de la tolerancia periférica	75
2.1. Los ratones Gadd45b ^{-/-} muestran un fenotipo inmunológico alterado en los órganos linfoides secundarios	75

2.2. Estudio del papel de Gadd45b y p38 en la función de las células T CD4 ⁺	82
2.2.1. Gadd45b es un regulador negativo de la proliferación de las células T CD4 ⁺ en respuesta a la estimulación de TCR	82
2.2.2. Gadd45b regula la muerte inducida por activación en células T CD4 ⁺	83
2.2.3. p38 α es un regulador negativo de proliferación y un modulador positivo de apoptosis en células T CD4 ⁺ en respuesta a la estimulación del TCR ..	84
2.2.4. Gadd45b controla la producción de IFN γ inducida por estimulación del TCR en células T _{h1}	88
2.2.5. p38 α y p38 β regulan la producción de IFN γ inducida por estimulación del TCR pero únicamente p38 α regula la producción inducida por citoquinas en células T _{h1}	90
2.2.6. Gadd45b, p38 α y p38 β controlan la producción de TNF α en las células T _{h1}	91
2.2.7. Posible regulación por parte de Gadd45b de la producción de IL4 en células T _{h2} de manera independiente de p38	92
3. Estudio del papel de Gadd45b en el control de la tolerancia central	93
3.1. Hiperplasia del timo y regresión defectuosa en ratones Gadd45b ^{-/-}	93
3.2. Poblaciones tímicas alteradas en ratones Gadd45b ^{-/-} mayores	94
3.3. Gadd45b controla la activación de p38 y JNK implicadas en el proceso de selección tímica	95
3.4. Los timocitos Gadd45b ^{-/-} son resistentes a la muerte inducida a través de TCR <i>in vivo</i>	96
3.5. Fallo en la señalización de MAPK <i>in vivo</i> en los timocitos deficientes en Gadd45b	99

Índice

3.6. Fallo en la apoptosis *in vivo* por vía mitocondrial en los timocitos

deficientes en Gadd45b 99

DISCUSIÓN 103

1. Gadd45b y p38 controlan la tolerancia periférica 105

2. Gadd45b controla el mantenimiento de la tolerancia central 112

CONCLUSIONES 117

BIBLIOGRAFÍA 121

A horizontal bar with a gradient from dark orange on the left to light orange on the right.

AGRADECIMIENTOS

Después de tanto tiempo y esfuerzo invertido en esta tesis lo primero es agradecer a tanta gente que me ha ayudado en el transcurso de estos años, sin todos ellos todo habría sido mucho más difícil. Gracias por ayudarme a realizar mi sueño.

En primer lugar, me gustaría agradecer al director de esta tesis, Jesús Salvador, la confianza que depositó en mí al permitirme trabajar en su grupo y en un departamento donde he conocido a gente tan maravillosa y he crecido tanto personal como profesionalmente.

Quiero agradecer a los doctores Angel Nebreda e Iván del Barco que nos permitieron estudiar los ratones deficientes en p38 α y p38 β . Gracias por su apoyo y colaboración.

No me quiero olvidar de agradecer a la Dra. Ana Villegas quien me brindó la oportunidad de dar mis primeros pasos en mi vida científica. Gracias a todos los miembros del grupo, en especial a Celes, Tina, Paloma y Ata, que me enseñaron y ayudaron siempre que lo necesité.

También quiero dar las gracias a mis compañeros de grupo, muy especialmente a Sara y Mercedes. Sin vosotras esta tesis no habría sido posible. Gracias por vuestro apoyo continuo, vuestra guía, consejos, enseñanzas y un largo etcétera. Ha sido un verdadero placer trabajar junto a vosotras y aprender de vosotras. No me quiero olvidar de los demás miembros del grupo, empezando por Vanesa que tanto me ha ayudado con los ratones; gracias por hacerlo todo tan fácil. También quiero agradecer su apoyo a Noemí y Javi, que aunque ya no estén me sigo acordando mucho y os echo de menos. A Bea, Laura, Mireya, Heiko y Umberto, gracias por vuestros ánimos y por esos buenos ratos por los pasillos compartiendo “experiencias”.

Por supuesto, también quiero agradecer al personal del laboratorio 411 que me han hecho sentir como en casa y me han dado todo su apoyo y ayuda siempre que la he necesitado. Aquí quiero hacer una mención especial a Agnes por escucharme y aconsejarme con tanta paciencia, ha sido un placer trabajar a tu lado estos años.

A lo largo de estos años he podido hacer muchos amigos dentro del CNB, muchas gracias a todos por esas cenas tan geniales, los partidos de volley, las fiestas de disfraces, las tertulias científicas y no tan científicas... En especial quiero agradecer al “equipo Myc”, David y Maitane, con los que he pasado todos estos años desde el primer día. Gracias por todos los buenísimos momentos que hemos pasado juntos, las comidas, las “huidas”, nuestras escapadas, los chistes, las fiestas, pero sobre todo gracias por vuestra amistad. Ha sido maravilloso conocerlos. También quiero agradecer a Cris y Katy, a vosotras os conocí más tarde, sobre todo a Katy, pero habéis sido para mí unas amigas excepcionales y un gran apoyo. Ha sido genial compartir tantos momentos juntas, tanto dentro como fuera del “labo”. Gracias por vuestros ánimos, vuestras sonrisas, gracias por el día a día.

No quiero dejar de agradecer al personal del departamento que hace que nuestro trabajo sea más fácil. Gracias a Antonio y a Coral, gracias al personal de cocinas y al personal de citometría, en especial a M^a Carmen por su gran ayuda y a Sara por su apoyo y su constante alegría contagiosa.

Agradecimientos

Fuera del CNB mucha gente me ha dado su apoyo durante estos años. En primer lugar tengo que dar las gracias a mis “niños” Oli, Vinny, Iker, Enrique y Eddy que aunque ahora estemos lejos siempre estáis en mis pensamientos. Durante años hemos sido como una familia, gracias por todo el cariño que me dais. Os quiero. También quiero agradecer a Maite y a Nerea por su apoyo y amistad incondicional durante tantos años. Gracias por desconectarme de vez en cuando y hacerme olvidar las preocupaciones.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, M^a Carmen y Leo, que me lo han dado todo. Gracias por apoyarme y animarme en todo lo que me he propuesto y por estar siempre a mi lado. Sois los mejores. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Os quiero. También quiero dar las gracias a mi tía Fru, que es como una segunda madre para mí, por animarme y apoyarme siempre. Y por supuesto, a mi abuelo por ser siempre tan bueno. Eres un ejemplo a seguir. Esta tesis va dedicada a ellos, a mi familia, pero sobre todo va dedicada a mis abuelas, que hace tiempo que nos dejaron pero siempre están muy presentes y sé que estarán muy orgullosas.

Para finalizar, quiero dar las gracias a Sergio, el amor de mi vida, que me ha aguantado tanto sin rechistar incluso desde la distancia. Gracias por ser tan bueno conmigo, tan paciente, estar dispuesto a escucharme siempre, aguantar mis enfados y mis agobios, sobre todo en esta última etapa tan dura. Sin ti no habría podido seguir. Gracias por darme la fuerza y el amor necesarios para continuar. Te quiero.



ABREVIATURAS

αCD3: anti-CD3	Gadd45: gen de parada del crecimiento inducible por daño en el ADN
αCD28: anti-CD28	GADS: proteína adaptadora relacionada con Grb2
ADN: ácido Desoxirribonucleico	G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos
AICD: muerte celular inducida por activación	HRP: peroxidasa de rábano
AP-1: proteína activadora 1	IFNγ: interferón gamma
APC: alofocianina	Ig: inmunoglobulina
APCs: células presentadoras de antígenos	IL: interleuquina
ATF2: factor de transcripción activador 2	IP: yoduro de propidio
ATP: adenosín trifosfato	IP₃: inositol trifosfato
BCA: ácido bicinchonínico	ITAM: motivo de activación del inmuno-receptor basado en tirosinas
BCR: receptor de células B	JNK: quinasa N-terminal de c-Jun
bp: pares de base	KDa: KiloDalton
BSA: albúmina de suero bovino	KI: Knock-In
CD: conjunto de diferenciación	LAT: adaptador para la activación de células T
Cdk1: quinasa dependiente de ciclina 1	LPS: lipopolisacárido
CFSE: Carboxifluorescein diacetato succinimidil ester	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
CNB: Centro Nacional de Biotecnología	MEFs: fibroblastos embrionarios de ratón
CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
ConA: Concanavalina A	min: minutos
Cre: recombinasa cíclica	MKK: quinasa de MAPK
c.p.m.: cuentas por minuto	MKKK: quinasa de MKK
DAG: diacilglicerol	NFAT: factor nuclear de células T activadas
DN: dobles negativas	NFκB: factor nuclear κ B
dn: dominante negativo	NK: células asesinas naturales
DP: dobles positivas	OHT: hidroxí-tamoxifeno
ds-ADN: ADN de doble hebra	OPD: <i>o</i> -fenilendiamina dihidrocloruro
ECL: Electroquimioluminiscencia	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
EDTA: ácido etilen-diaminotetra-acético	PBS: tampón fosfato salino
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	PBS/T: PBS con Tween20
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares	PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
ERT: receptor de estrógeno	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
FasL: ligando de Fas	PE: ficoeritrina
FCS: suero fetal bovino	PerCP: clorofila peridina
FITC: fluoresceína	

Abreviaturas

- PIP₂**: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PLC γ 1: fosfolipasa C γ 1
PKC θ : proteína quinasa C θ
PVDF: fluoruro de polivinilideno
RERTn: Cre recombinasa inducible por tamoxifeno
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecilsulfato sódico
s.e.m.: error estándar de la media
SLP76: proteína de 76 KDa de leucocitos con dominios SH2
SP: Simples positivas
ss-ADN: ADN de hebra simple
TAE: Tampón Tris/Acetato/EDTA
TBS: Tampón Tris salino
TBS/T: TBS con Tween20
TCR: receptor de células T
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TGF β : Factor de crecimiento tumoral β
TNF α : Factor de necrosis tumoral α
T_c: células T citotóxicas
T_h: células T cooperadoras
T_{reg}: células T reguladoras
wb: western blot
wt: tipo silvestre
UV: ultravioleta
ZAP70: proteína de 70 KDa asociada a la cadena ζ



INTRODUCCIÓN

1. Propiedades generales de la respuesta inmunológica

El sistema inmunológico se encarga de combatir las infecciones por patógenos tanto intracelulares como extracelulares, manteniendo la tolerancia con los componentes propios del organismo. Ante una infección existen dos tipos de respuestas: innata y adaptativa (Abbas y *col.*, 2010).

- Inmunidad innata: es inespecífica y se caracteriza por facilitar una respuesta rápida. Está formada por una primera línea de barreras físicas que son la piel y las mucosas, además de factores solubles y proteínas, como las proteínas de fase aguda, el complemento e interferones. Por último, también participan células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos y las células asesinas naturales (NK).

- Inmunidad adquirida: esta respuesta es más evolucionada. Es específica de antígeno y, aunque es más lenta que la innata, prevalece más tiempo y tiene la capacidad de generar memoria inmunológica. Existen dos tipos de respuestas adquiridas: humoral y celular. La respuesta humoral se lleva a cabo por los linfocitos B que son capaces de diferenciarse y producir anticuerpos específicos de cada antígeno. La respuesta celular se lleva a cabo por los linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos- T_c) que secretan enzimas capaces de lisar las células infectadas. Lo que determina la respuesta que se genera es el tipo de patógeno y la respuesta de otra población de linfocitos T, los T CD4⁺ (cooperadores- T_h). Estas células, según el antígeno con el que se encuentren, producen distintas citoquinas que inician y dirigen la respuesta inmunológica adquirida.

El sistema inmunológico posee mecanismos que aseguran la tolerancia con los antígenos propios. El correcto funcionamiento requiere estrictos mecanismos de control para evitar la supervivencia de células auto-reactivas que puedan producir una enfermedad autoinmune. La tolerancia inmunológica ocurre en linfocitos T y B, se adquiere durante su maduración y se mantiene en las células maduras. El control de las células T auto-reactivas que ocurre durante su desarrollo en el timo es conocido como tolerancia central. Los mecanismos de tolerancia central incluyen el proceso de selección de las cadenas del receptor de células T (TCR) y de selección positiva y negativa que se describirán en los apartados 2.4 y 2.5.

Por otro lado, una vez que las células salen del timo, ya en los órganos linfoides secundarios, existen mecanismos que controlan la respuesta de las posibles células auto-reactivas que hayan escapado a la tolerancia central, estos mecanismos son conocidos como tolerancia periférica (Romagnani, 2006). Se han descrito principalmente tres mecanismos de tolerancia periférica: anergia (ausencia de respuesta), apoptosis (conocida como muerte celular inducida por activación, AICD; se describe en el apartado 2.1) y supresión inmunológica (llevada a cabo por las células T reguladoras) (Malek, 2008; Romagnani, 2006).

Los fallos en cualquiera de estos mecanismos suponen la ruptura de la tolerancia inmunológica, lo que podría favorecer la aparición y/o supervivencia de células T auto-reactivas que provocarían una enfermedad autoinmune.

2. Linfocitos T

El linaje de las células T es capaz de responder a una variedad prácticamente infinita de antígenos exógenos principalmente porque está compuesto por un gran repertorio de células T, cada una con un receptor de antígeno único. Esto hace inevitable la existencia de células T que reconozcan antígenos propios y que puedan provocar peligrosas reacciones autoinmunes. Por ello, existen estrictos mecanismos de regulación, tanto durante el desarrollo en el timo como durante la respuesta inmunológica en la periferia, que evitan la formación y supervivencia de las células peligrosas (Romagnani, 2006).

2.1. Activación de los linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ circulan continuamente desde la sangre hasta los órganos linfoides secundarios (nódulos linfoides, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas) donde se concentran y entran en contacto con antígenos. Estos linfocitos reconocen, a través del TCR, los antígenos unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que expresan las células presentadoras de antígeno (APCs). Los linfocitos T CD4⁺ *naïve* o vírgenes solo pueden reconocer antígenos si son presentados por las moléculas MHC-II de las células presentadoras (Fig. I1). Para la activación de la célula T CD4⁺ se requiere una señal adicional o co-estimuladora, además de la estimulación del TCR. Esta señal co-estimuladora viene dada por la interacción de CD28 (en el linfocito T) y B7 (en la célula presentadora). En ausencia de esta señal co-estimuladora se produce un estado de anergia en el que el linfocito es incapaz de responder correctamente al estímulo del TCR (Appleman y Boussiotis, 2003; Jenkins y col., 1991).

Una vez activada la célula T se diferenciará a una célula efectora, dos de las acciones más rápidas son la síntesis de interleuquina-2 (IL2) y la expresión de grandes cantidades de CD25 (subunidad α del receptor de IL2) (Malek, 2008) que se correlaciona con una mayor respuesta proliferativa de manera autocrina y es indicativo del estado de activación de las células.

Después de una respuesta a un antígeno es necesario que esta finalice, para ello las células T llevan a cabo un proceso de apoptosis (AICD) que representa el principal mecanismo homeostático del sistema inmunológico. Suele ocurrir cuando las células T se encuentran con un antígeno a altas concentraciones o la activación es muy robusta. La activación de la célula T conduce a la co-expresión del receptor Fas y su ligando (FasL) provocando la muerte de la propia célula y de las de su alrededor. La activación repetida del TCR y la interacción Fas-FasL activa la cascada de caspasas que finaliza con la muerte celular. Este proceso, además, se ve potenciado por la acción de la IL2 (Romagnani, 2006; Van Parijs y Abbas, 1998)

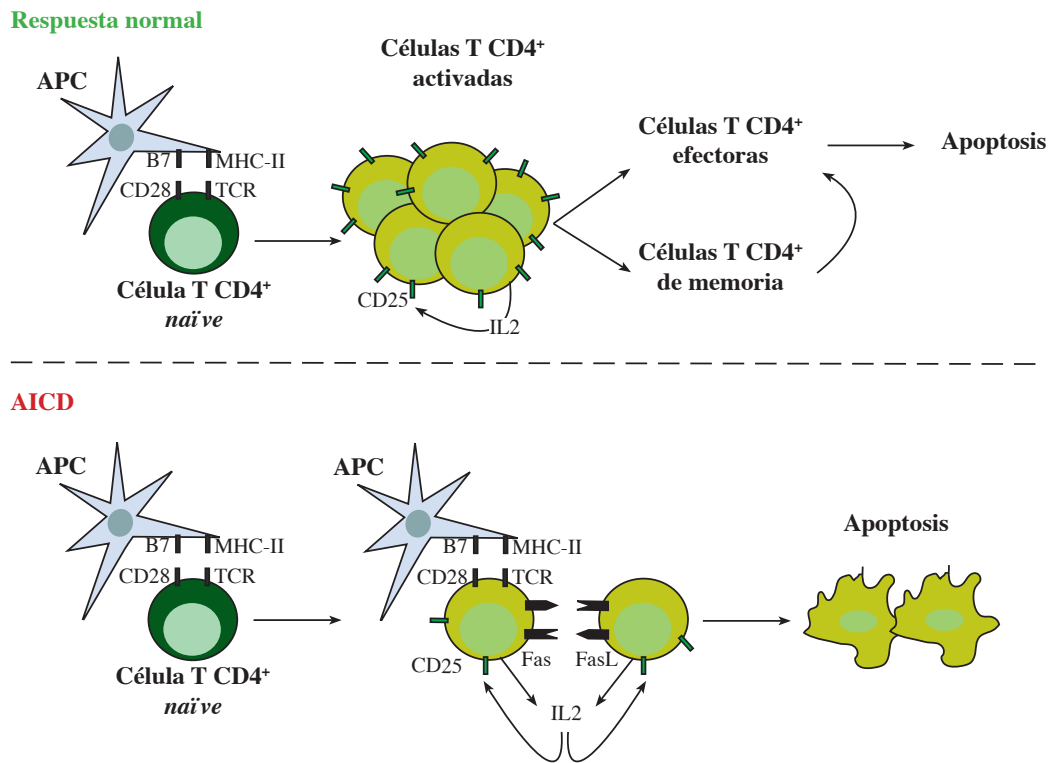


Figura 11. Respuesta de las células T ante la estimulación del TCR. Cuando las células T CD4⁺ se exponen a un antígeno presentado por las APCs proliferan y producen grandes cantidades de IL2 antes de diferenciarse a células efectoras o convertirse en células de memoria, capaces de dar una respuesta más rápida en caso de encontrarse de nuevo con el mismo antígeno. Las células efectoras una vez que han realizado su función, mueren por apoptosis; cuando se produce una estimulación secundaria del TCR, las células aumentan la expresión de Fas y FasL provocando la muerte conocida como AICD.

Después de la exposición a un antígeno, las células T *naïve* también pueden convertirse en células de memoria. Estas células se caracterizan por tener una vida larga y estar preparadas para responder más rápidamente al mismo estímulo; se mantienen en un estado de reposo siendo sensibles a la estimulación del TCR que las células T *naïve*, responden de una forma más rápida e intensa, proliferando y produciendo citoquinas, y presentan una mayor resistencia a la apoptosis (Metz y Bottomly, 1999). Las células de memoria y las células *naïve* se diferencian por la expresión de ciertas moléculas de adhesión como CD62L (L-selectina), necesaria para la recirculación y la entrada en los nódulos linfáticos, y CD44 (receptor del ácido hialurónico), implicada en el reclutamiento de los linfocitos a la zona de inflamación. Las células *naïve* expresan preferentemente CD62L y niveles bajos de CD44 mientras que las células de memoria disminuyen la expresión de CD62L y aumentan la de CD44 (Dutton y col., 1998).

2.2. Función efectora de las células T CD4⁺. Células T_{h1} y T_{h2}

Durante la activación, las células T CD4⁺ pueden diferenciarse en distintos linajes de células T cooperadoras, T_{h1} o T_{h2}, para adecuarse al tipo de respuesta que se necesite en cada momento.

Introducción

Ambas subpoblaciones pueden distinguirse por el patrón de citoquinas que producen, lo que a su vez diferencia las células dianas y las respuestas inmunológicas que modulan.

Las células T_{h1} producen principalmente interferón γ (IFN γ) pero también factor de necrosis tumoral α (TNF α) e IL2 (Zhu y col., 2010). Controlan la respuesta inmunológica celular frente a patógenos intracelulares. Activan a los macrófagos, potencian la citotoxicidad de las células T CD8⁺ y favorecen la producción de inmunoglobulinas (Ig) G por parte de las células B. Una activación anormal de las células T_{h1} se ha observado en determinadas enfermedades autoinmunes crónicas, tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o esclerosis múltiple, y se cree que es un evento crítico para su desarrollo (Romagnani, 2006; Zhu y Paul, 2008).

Por otro lado, las células T_{h2} producen principalmente interleuquina 4 (IL4), pero también interleuquina 5 (IL5) y 13 (IL13) (Zhu y col., 2010). Participan organizando la respuesta inmunológica humoral frente a patógenos extracelulares, activando los eosinófilos así como la producción de IgE por parte de las células B. Las células T_{h2} están implicadas en la inducción y persistencia del asma y otras enfermedades alérgicas (Romagnani, 2006; Zhu y Paul, 2008).

La diferenciación de una célula T CD4⁺ hacia T_{h1} o T_{h2} depende de la combinación de citoquinas que estén presentes en el ambiente celular durante la activación del TCR. Así la IL12 y el IFN γ favorecen el desarrollo de las células T_{h1} e inhiben el desarrollo de las células T_{h2} . Por el contrario, la IL4 dirige la diferenciación hacia T_{h2} y la inhibe hacia T_{h1} (Fig. I2). Esto permite un mecanismo de regulación entre las dos subpoblaciones, de modo que exista un equilibrio crítico para la protección frente a patógenos (Zhu y Paul, 2008) y para evitar reacciones autoinmunes (Horwitz y col., 1998; Liblau y col., 1995).

Además de estas dos subpoblaciones (T_{h1} y T_{h2}), recientemente, se han descrito otros dos tipos de células T CD4⁺: por un lado, las células T reguladoras (T_{reg}) y, por otro, las células T_{h17} . Las células T_{reg} son críticas regulando la respuesta inmunológica y evitando la autoinmunidad; estas células secretan el factor de crecimiento tumoral β (TGF β), una citoquina inmuno-supresora, que inhibe la diferenciación de las células T_{h1} y T_{h2} . Una alteración de su función puede conducir al desarrollo de enfermedades, por exceso puede llevar a una disminución en la inmunidad (con desarrollo de tumores o infecciones) mientras que por defecto puede conducir al desarrollo de autoinmunidad (Cools y col., 2007; Romagnani, 2006).

Las células T_{h17} están implicadas en la respuesta inmunológica frente a bacterias extracelulares y algunos hongos, producen IL17, una citoquina pro-inflamatoria. Se han encontrado elevados niveles de IL17 en algunas enfermedades autoinmunes. La diferenciación de las células T_{h17} es inhibida por la IL4, el IFN γ y también por la IL2 (Malek, 2008; Romagnani, 2006).

Como se observa en la figura I2, existe una estrecha regulación entre las subpoblaciones de células T CD4⁺ necesaria para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica.

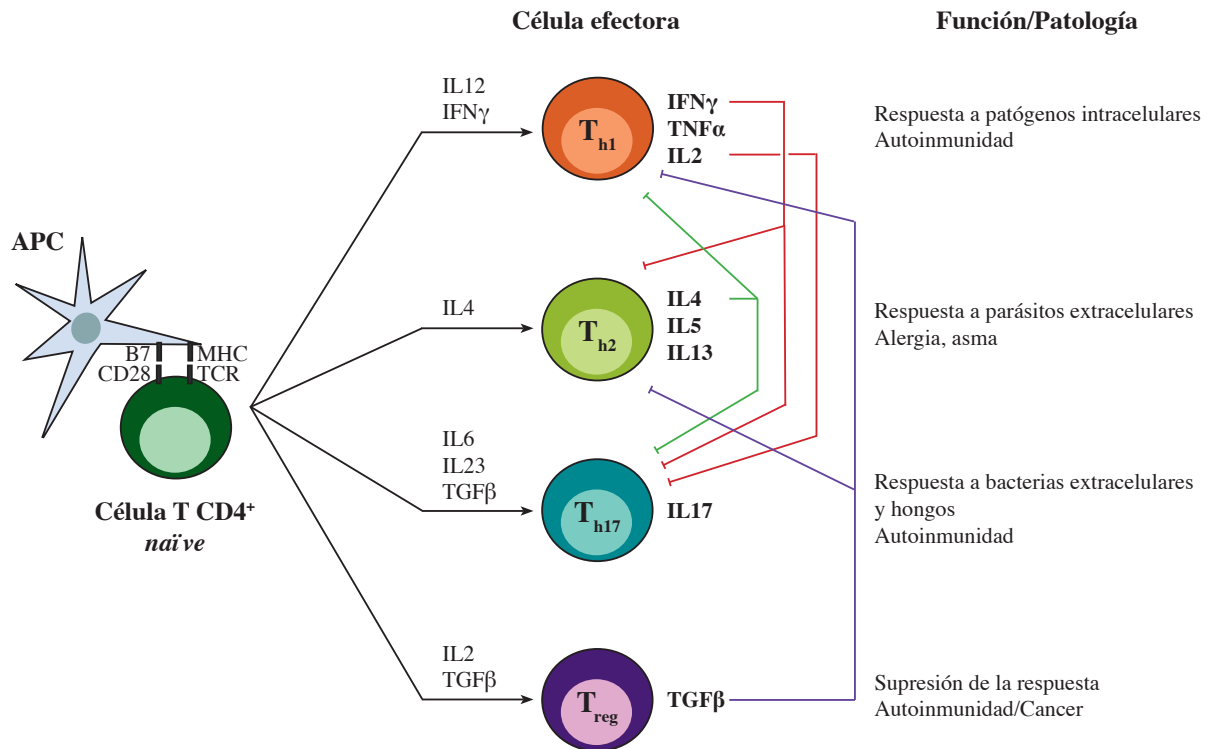


Figura I2. Diferenciación de las células T CD4⁺ hacia células efectoras. Después de la presentación de un antígeno las células T CD4⁺ se pueden diferenciar, según las citoquinas del ambiente celular, en células efectoras T_{h1}, T_{h2} y T_{h17} o células reguladoras T_{reg}. Cada una de estas subpoblaciones produce un patrón de citoquinas característico y tiene una función específica. Existe una estrecha regulación entre los 4 tipos celulares, que evita patologías derivadas de su desregulación.

2.3. Señalización del TCR

El TCR es una molécula formada por dos cadenas polimórficas (α y β), que, por un lado, le confieren la especificidad de antígeno y, por otro, forman el sitio de unión al antígeno presentado por el MHC. Estas cadenas están unidas covalentemente al complejo CD3, que es el encargado de la transducción de la señal (de hecho un anticuerpo anti-CD3 produce la activación del linfocito T). Las cadenas CD3 (γ , δ , ϵ y ζ) tienen largos dominios citoplasmáticos denominados ITAM (motivos de activación del inmuno-receptor basado en tirosinas) que contienen residuos de tirosina y son la diana de las fosforilaciones de las quinasas de la familia Src (Lck principalmente en las células T CD4⁺ y Fyn en las T CD8⁺) (Davis y col., 2003; Smith-Garvin y col., 2009).

Tras la unión del complejo TCR/CD3 al MHC-péptido se aproxima el co-receptor CD4 o CD8, esta asociación activa a las quinasas de la familia Src que fosforilan los motivos ITAM (Fig. I3). Esta fosforilación le permite a la cadena ζ unirse a la quinasa ZAP70 (proteína de 70 KDa asociada a la cadena ζ) que es activada por Lck y por auto-fosforilación. A continuación, ZAP70 activa diversos sustratos entre los que se encuentran las proteínas adaptadoras LAT (adaptador para la activación de las células T) y SLP76 (proteína de 76 KDa de leucocitos con dominios SH2), así como la fosfolipasa C γ 1 (PLC γ 1). Las proteínas LAT y SLP76 permiten el reclutamiento y la

Introducción

unión de otras proteínas como PLC γ 1, GADS (proteína adaptadora relacionada con Grb2) o Vav entre otras.

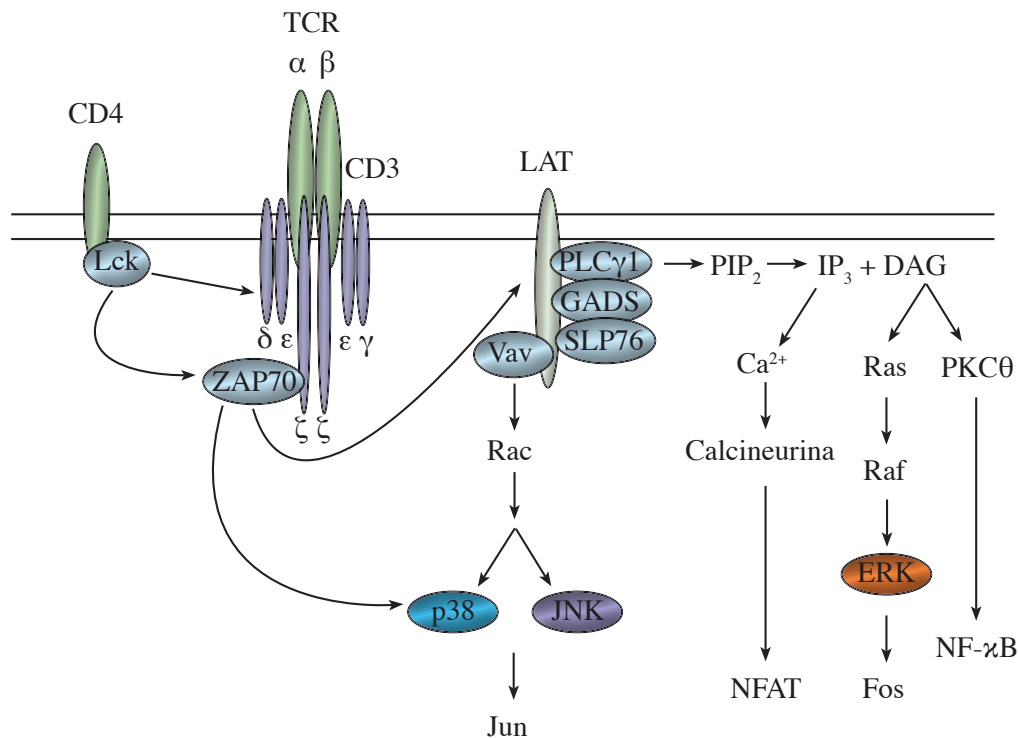


Figura I3. Representación esquemática de la señalización del TCR en células T CD4⁺. La interacción entre el TCR y el complejo MHC-péptido activa Lck (unida al co-receptor CD4) que fosforila los motivos ITAM de las cadenas del complejo CD3. A continuación ZAP70 es reclutada y fosforilada por Lck, a su vez ZAP70 inicia la activación de distintas proteínas que culminan con la movilización de calcio, la activación de Ras y la ruta de las MAPK, así como la activación de distintos factores de transcripción (NFAT, NF κ B, Jun y Fos entre otros).

La activación de la PLC γ 1 da lugar a la liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$). Por un lado, el IP $_3$ libera calcio (Ca $^{2+}$) del retículo endoplasmático lo que activa la Calcineurina que defosforila el factor nuclear de las células T activadas (NFAT) permitiendo su translocación al núcleo. Por otro lado, el DAG activa la proteína quinasa C θ (PKC θ) que está implicada en la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B). El DAG también inicia la ruta de Ras que culmina con la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

Por otra parte, el complejo LAT-GADS-SLP76 recluta otros factores entre los que se encuentra Vav que contribuye a la activación de las otras MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) p38 y JNK (quinasa N-terminal de c-Jun) (Horejsi y col., 2004; Lindquist y Schraven, 2007; Love y Hayes, 2010).

De forma alternativa, exclusivamente en las células T, existe una ruta adicional de activación de la quinasa p38 en la que participan Lck y ZAP70 y que se explicará más adelante en el apartado 4.2 (Salvador y col., 2005b).

Finalmente, esta cascada de señalizaciones culmina con la activación de factores que inducen

la transcripción de un gran número de genes implicados en la respuesta inmunológica. Los más destacados son NFAT, NF- κ B y Fos y Jun que forman el complejo AP-1 (Lindquist y Schraven, 2007). La consecuencia de esta cascada de señalizaciones es la reorganización del esqueleto de actina, la proliferación y diferenciación, así como la función efectora de los linfocitos T.

2.4. Desarrollo de los linfocitos T en el Timo

Se han identificado dos linajes de linfocitos T según las moléculas que constituyen el TCR: el linaje constituido por las cadenas $\alpha\beta$ (linaje mayoritario, 90-95% de las células T periféricas) y el constituido por las cadenas $\gamma\delta$ (linaje minoritario, 5-10% de las células T periféricas). Dentro de la población mayoritaria (TCR $\alpha\beta$) existen dos subpoblaciones, las células T CD4⁺ y las CD8⁺ (Hayday y Pennington, 2007). El timo es el órgano linfoide primario donde se desarrollan las células T (o timocitos) a partir de precursores que migran desde la médula ósea por vía sanguínea (Ceredig y Rolink, 2002).

A pesar de ser una parte muy importante del sistema hematopoyético, el timo carece de células madre que aseguren la renovación celular, necesita el aporte continuo de los precursores de la médula ósea (Linton y Dorshkind, 2004) para asegurar la variabilidad del repertorio de células T. Esto no ocurre de la misma forma durante toda la vida del animal, el timo sufre un proceso de regresión en el que tanto el número de células como el peso se empiezan reducir, en el caso del ratón, a partir de la sexta semana de vida (Sempowski y col., 2002). A medida que avanza en edad se produce una pérdida significativa de formación de nuevas células T que provoca la reducción en la diversidad y el número de las células que salen a periferia (Linton y Dorshkind, 2004; Taub y Longo, 2005). La regresión tímica ocurre en muchos mamíferos, incluido el hombre, y contribuye al declive que se observa en la función de las células T durante el envejecimiento que conlleva una mayor susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes o cáncer (Taub y Longo, 2005).

Anatómicamente el timo se divide en corteza, donde tiene lugar la diferenciación, y médula, donde las células maduran antes de salir a periferia (Ceredig y Rolink, 2002). En la corteza se encuentran las células más inmaduras llamadas dobles negativas (DN: CD4⁻CD8⁻) porque no expresan ninguno de los marcadores CD4 o CD8 y constituyen aproximadamente el 5% de la población del timo. Las células DN se dividen a su vez, según la expresión de los marcadores CD44 y CD25, en DN1 (CD44⁺CD25⁻), DN2 (CD44⁺CD25⁺), DN3 (CD44⁻CD25⁺) y DN4 (CD44⁻CD25⁻) (Hayday y Pennington, 2007). Durante el paso de DN2 a DN3 ocurre una primera selección de los timocitos que han conseguido un reordenamiento productivo de la cadena β del TCR (los que no lo consiguen mueren por apoptosis); posteriormente, en el paso de DN3 a DN4 se produce el reordenamiento de la cadena α . Durante la maduración entre las DN1 y las DN3, un pequeño porcentaje de células reordena las cadenas γ y δ y terminan diferenciándose en los linfocitos T $\gamma\delta$ que migrarán, principalmente, a la piel y a las mucosas (Hayday, 2000). Siguiendo con su desarrollo, los timocitos DN4 que han reordenado el TCR $\alpha\beta$ pasan por un estado intermedio en el que expresan cantidades pequeñas de CD8, pero rápidamente expresan CD4 pasando al estado

de dobles positivas (DP: CD4⁺CD8⁺). Estas células constituyen aproximadamente el 80% de la población tímica. Durante el estado de DP ocurre un proceso de selección (ver apartado 2.5), en la intersección córtico-medular, que da como resultado la maduración de las células hacia simples positivas (SP) CD4⁺(CD8⁻) o SP CD8⁺(CD4⁻), que constituyen un 10 y un 5% de la población tímica, respectivamente. Sólo esta pequeña población de timocitos SP sobrevive y, después de una breve proliferación y maduración en la médula, migran a la periferia como células T $\alpha\beta$ maduras (en adelante células T) (Gill y col., 2003).

2.5. Selección tímica

Durante el estado de DP, los timocitos sufren un proceso de selección para asegurar que las células T maduras que salen a periferia son funcionales y tolerantes con los antígenos propios (no auto-reactivos) (Gill y col., 2003). La mayoría de las células DP mueren por apoptosis porque son incapaces de reconocer el MHC, que en este caso expresan las células epiteliales tímicas que actúan como APCs. El resto de timocitos, pasan por dos tipos diferentes de selección: positiva y negativa. Por un lado, si el TCR reconoce con baja afinidad un péptido propio presentado por un MHC propio, es decir, es tolerante con el antígeno propio, el timocito es seleccionado positivamente y continúa su desarrollo. Por el contrario, si el TCR reconoce con alta afinidad el complejo MHC-péptido propio, el timocito se elimina por selección negativa y muere por apoptosis evitando que migren a periferia donde podrían causar autoinmunidad (Gill y col., 2003; Starr y col., 2003; Werlen y col., 2003). Las células que sobreviven se diferenciarán a SP CD4, si han reconocido un antígeno presentado en un MHC de clase II, y a SP CD8, si lo han reconocido en un MHC de clase I.

Se ha propuesto que la forma que tiene el timocito de discriminar entre los dos tipos de señales es a través del número de receptores ocupados, de tal manera que un ligando de alta afinidad ocupará más receptores que uno de baja afinidad (Ashton-Rickardt y col., 1994; Sebzda y col., 1994). Otra teoría sugiere que es el tiempo de “ocupación” de los receptores lo que define cada tipo de señal, de tal modo que los ligandos de alta afinidad estarán en contacto con el TCR tiempos más largos que los de baja afinidad (Jameson y col., 1995). Ambos modelos sugieren que los dos tipos de señales (selección positiva o negativa) implicarían cinéticas distintas en la señalización del TCR. A este respecto, estudios recientes sugieren que la ruta de las MAPKs (ver más adelante apartado 4.3) podría estar implicada en el proceso y que la cinética de activación de estas MAPKs determina el tipo de selección (Fig. I4). Los ligandos que inducen selección positiva generan una activación suave pero sostenida de ERK que determina la supervivencia de la célula, mientras que los que inducen selección negativa generan una activación fuerte pero transitoria de ERK, además de la activación de p38 y JNK (Gong y col., 2001; Yun y Bevan, 2001) que determina la entrada en apoptosis.

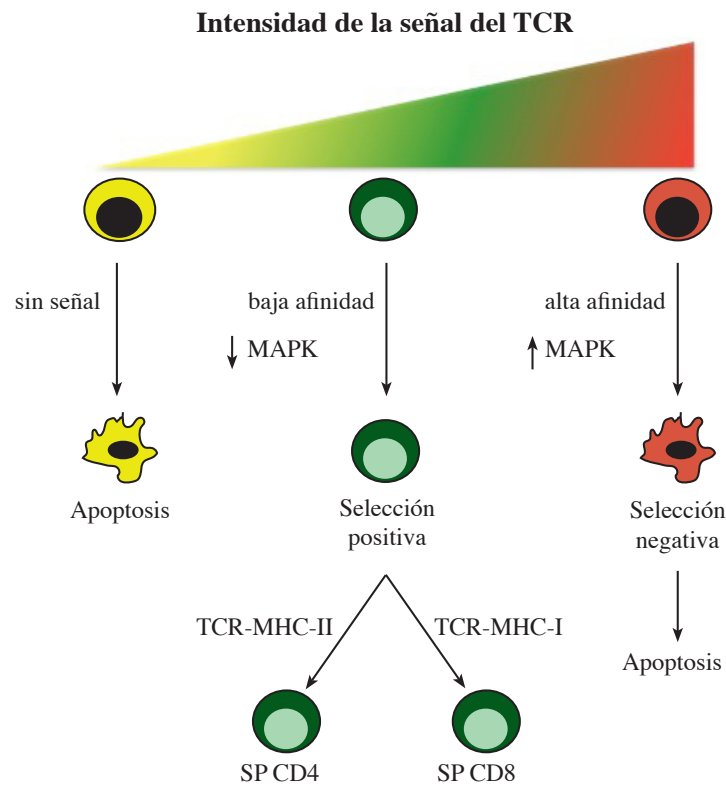


Figura I4. Selección positiva y negativa en los timocitos. La mayoría de las células DP mueren por no ser capaces de reconocer el MHC propio y por lo tanto el TCR no transmite ninguna señal. El resto, si reconoce el MHC con baja afinidad, transmite una señal suave que induce la selección positiva de esas células y su maduración a SP CD4 o CD8, según sea la clase del MHC. Por el contrario, si reconocen el MHC con alta afinidad, el TCR transmite una señal de alta intensidad que culmina con la apoptosis de la célula. Se representa la diferente señalización de las MAPK según el tipo de selección.

3. Función de Gadd45b en la respuesta inmunológica

3.1. La familia Gadd45

La familia Gadd45 (genes de parada del crecimiento inducibles por daño en el ADN) está formada por Gadd45a (Gadd45 α /Gadd45), Gadd45b (Gadd45 β /MyD118) y Gadd45g (Gadd45 γ /CR6). Estos genes codifican pequeñas proteínas (18 KDa) ácidas que se encuentran principalmente, pero no exclusivamente, en el núcleo. Tienen una alta homología entre sí (55-58% en la secuencia de aminoácidos) y un 90% con sus ortólogos humanos (Carrier y col., 1994; Takekawa y Saito, 1998; Vairapandi y col., 2002; Zhang y col., 1999b). Su expresión se induce por varios tipos de estrés, incluyendo metil metano sulfonato (MMS), luz ultravioleta (UV), radiación γ y estrés oxidativo, y también por citoquinas inflamatorias, inductoras de diferenciación terminal o de apoptosis (Gupta y col., 2005; Liebermann y Hoffman, 1998; Takekawa y col., 2011).

Los genes *gadd45* se expresan en multitud de tejidos pero cada uno a diferentes niveles (Zhang y col., 1999b). Este patrón único de expresión de cada gen concuerda con los diferentes papeles de cada uno en respuesta a los distintos estímulos y en los diferentes contextos celulares.

3.2. Estructura y función biológica de las proteínas Gadd45

Se ha descrito la estructura del Gadd45a humano y Gadd45g humano y murino, en el caso de Gadd45b solo existe un modelo predictivo. Diversos estudios han demostrado que estas proteínas forman homo- y hetero-dímeros entre los miembros de la familia a través de interacciones hidrofóbicas. En el caso de Gadd45b se ha descrito que, en solución, existe preferiblemente como un homodímero y esta dimerización es esencial para su función. Las tres proteínas tienen dominios altamente conservados, en las regiones N- y C-terminal, implicados en la dimerización, de tal manera que dejan libres los dominios menos conservados, en la región central, encargados de las interacciones y funciones específicas de cada isoforma (Sanchez y col., 2010; Schrag y col., 2008; Tornatore y col., 2008; Zhang y col., 2011).

Las proteínas Gadd45 tienen funciones comunes regulando procesos celulares como activación, proliferación, apoptosis, reparación del daño en el ADN y diferenciación (Fornace y col., 1989; Vairapandi y col., 1996) (Harkin y col., 1999; Hollander y col., 1999; Takekawa y Saito, 1998). En respuesta a diferentes tipos de estrés las proteínas Gadd45 se encargan de asegurar la supervivencia de la célula, deteniendo el ciclo celular para permitir la reparación del daño en el ADN y, en último término, induciendo apoptosis. Estas proteínas no tienen actividad enzimática conocida sino que sus funciones están mediadas por la interacción proteína-proteína con reguladores del ciclo celular como (Fig. I5):

- el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), con un papel muy importante en la replicación y reparación del daño en el ADN, así como en la progresión del ciclo celular. La interacción de PCNA con las proteínas Gadd45 bloquea la función de éstas en la inhibición del crecimiento celular, permitiendo que el ciclo continúe (Azam y col., 2001; Smith y col., 1994; Vairapandi y col., 1996).
- el complejo formado por la quinasa dependiente de ciclinas Cdk1(Cdc2) y la Ciclina B1, que regula la transición G₂/M. Las proteínas Gadd45 inhiben la actividad quinasa del complejo deteniendo el ciclo celular en respuesta a agentes que dañan el ADN (Vairapandi y col., 2002).
- el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p21, encargado de bloquear el ciclo celular en la transición G₁/S. La interacción entre las proteínas Gadd45 y p21 tiene un efecto sinérgico en el bloqueo del ciclo celular (Azam y col., 2001; Vairapandi y col., 1996).
- la quinasa MEKK4, que activa las rutas de p38 y JNK implicadas en la respuesta a estrés y asociadas a la inducción de apoptosis. Las proteínas Gadd45 se unen a la MEKK4 liberando un dominio auto-inhibitorio y exponiendo así el dominio catalítico de la quinasa (Chi y col., 2004; Takekawa y col., 2011; Takekawa y Saito, 1998).

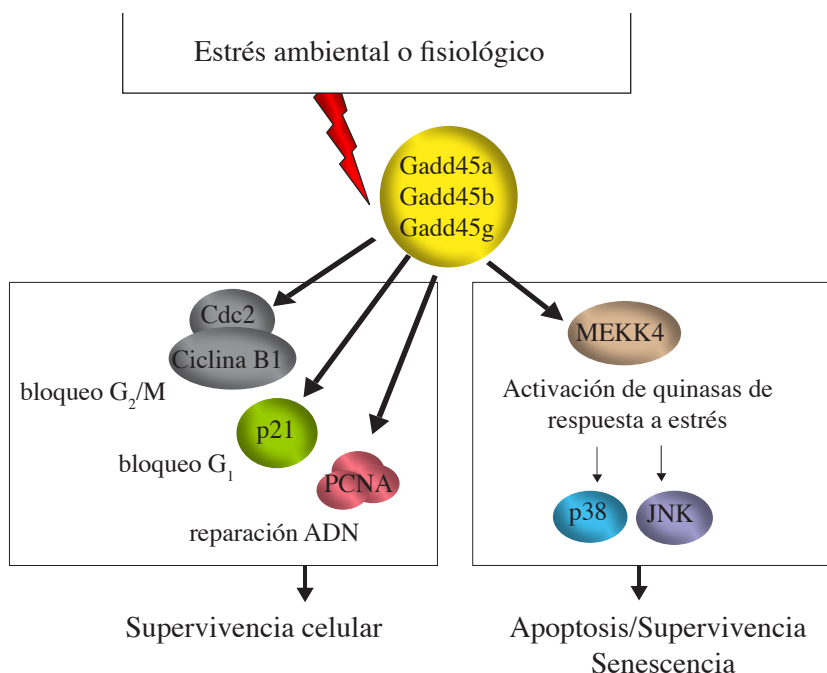


Figura I5. Interacciones y funciones comunes de las proteínas de la familia Gadd45. A través de la interacción con proteínas del ciclo celular como el complejo Cdc2/Ciclina B1, p21 y PCNA, las proteínas Gadd45 bloquean el ciclo en distintos estados lo que permite la reparación del daño en el ADN. Además interaccionan con la quinasa MEKK4 activando la ruta de p38 y JNK implicada en proliferación y apoptosis. Figura adaptada de (Liebermann y Hoffman, 2008).

Cada proteína tiene, además de las funciones comunes ya mencionadas, funciones específicas a través de interacciones específicas de cada miembro de la familia.

Gadd45a se expresa de forma ubicua y es el único miembro de la familia que es diana de p53 y BRCA1, juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica (Hollander y col., 1999) y la accesibilidad de la cromatina (Carrier y col., 1999). Los ratones deficientes en Gadd45a muestran un fenotipo similar al encontrado en los ratones deficientes en p53, es decir, inestabilidad genómica y anomalías cromosómicas, además de una mayor susceptibilidad de carcinogénesis inducida por radiaciones (Hollander y Fornace, 2002). En las células T CD4⁺ naïve, Gadd45a es un regulador negativo de la activación de p38 a través de la inhibición de la ruta alternativa (ver apartado 4.2) (Salvador y col., 2005a) (Fig I8). Las células T de los ratones deficientes muestran hiper-proliferación y, aunque no presentan diferencias en apoptosis, tienen una activación constitutiva de p38 que conduce al desarrollo espontáneo de autoinmunidad (Salvador y col., 2002; Salvador y col., 2005a). Gadd45b y Gadd45g parecen estar regulando procesos de diferenciación puesto que están regulados por señales implicadas en la diferenciación de distintos tipos celulares. Al contrario que Gadd45a, que tiene una expresión ubicua que no cambia después de la estimulación del TCR, la expresión de Gadd45b y Gadd45g se induce fuertemente durante la activación y diferenciación de las células T, sugiriendo un papel importante en estos procesos (Lu y col., 2001). La función y características de Gadd45b se describen en el siguiente apartado (3.3) con

más detalle. Gadd45g se describió por primera vez como un gen de respuesta inmediata a IL2 en células T (Beadling y col., 1993), su expresión también se induce después del tratamiento con IL-6, y por otras citoquinas como G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) y oncostatina M en diferentes tipos celulares (Jung y col., 2000; Nakayama y col., 1999; Zhang y col., 1999b). En las células T CD4⁺ *naïve* Gadd45g no se expresa, pero aumenta considerablemente en condiciones de polarización hacia T_{h1} o T_{h2}, aunque finalmente la expresión es mayor en las células T_{h1}. En los ratones deficientes en Gadd45g las células T_{h1} tienen menor apoptosis y menor producción de INF γ , en estas células la activación de p38 y JNK está disminuida (algo que no ocurre en las células T CD4⁺ *naïve*). Aunque no se ha descrito la aparición espontánea de autoinmunidad, sí se ha visto que los ratones deficientes en Gadd45g presentan una respuesta disminuida en la prueba de hipersensibilidad de contacto (Lu y col., 2001).

Por lo tanto, las proteínas de la familia Gadd45, de distintas formas, se encargan de mantener el normal funcionamiento de las células T. Se ha estudiado en profundidad la función de Gadd45a y algo menos la de Gadd45b y Gadd45g, que parecen tener funciones similares, pero todavía quedan muchos aspectos sin aclarar.

3.3. Papel de Gadd45b en la función de los linfocitos T

Al igual que los otros miembros de la familia, la expresión de Gadd45b se induce fuertemente en respuesta a distintos tipos de estrés. En las células del sistema inmunológico el patrón de expresión de Gadd45b, además, tiene otras particularidades. Se expresa en respuesta a citoquinas inflamatorias y otros factores como:

- IL6: en respuesta a esta citoquina, Gadd45b provoca la parada del ciclo celular y la diferenciación terminal en precursores mieloides (Abdollahi y col., 1991).
- IL12 e IL18: ambas citoquinas inducen la expresión de Gadd45b en las células T_{h1} (Yang y col., 2001).
- NF- κ B: la expresión de Gadd45b se induce por estímulos que activan NF- κ B, como LPS, TNF α o el TCR (De Smaele y col., 2001; Lu, 2006; Zhang y col., 2005a).
- TCR: en las células T CD4⁺ Gadd45b se induce rápidamente tanto en células *naïve* como activadas cuando son estimuladas a través del TCR, aunque la expresión mayor aparece en las células T_{h1} (Lu y col., 2004; Lu y col., 2001).

Además de las funciones ya descritas, que comparte con los otros miembros de la familia, Gadd45b está implicado en la regulación de la apoptosis, producción de citoquinas y la respuesta anti-tumoral. Una de las funciones más importantes de Gadd45b es la regulación de la apoptosis. Como se ha explicado en el apartado 2.1 la apoptosis es uno de los mecanismos principales para el mantenimiento de la tolerancia periférica. Se han descrito funciones tanto anti- como pro-apoptóticas dependiendo del estímulo y el tipo celular:

- Anti-apoptóticas: en las células T, Gadd45b inhibe la apoptosis inducida por TNF α o estrés osmótico a través de la activación de NF- κ B que induce la expresión de Gadd45b (De Smaele y col., 2001). En las células B, cuando se induce apoptosis a través de Fas, Gadd45b es el principal mediador del efecto anti-apoptótico de la co-estimulación de CD40 (Zazzeroni y col., 2003). También en células de médula ósea Gadd45b inhibe la apoptosis en respuesta a radiación UV (Liebermann y Hoffman, 2007).

- Pro-apoptóticas: en células de médula ósea y en hepatocitos Gadd45b induce apoptosis en respuesta a TGF β (Liebermann y Hoffman, 2007) a través de la activación de p38 (Yoo y col., 2003). También en hepatocitos, en respuesta a la estimulación de Fas, Gadd45b induce apoptosis potenciando la interacción entre p38 y la proteína del Retinoblastoma (Cho y col., 2010).

Otra de las funciones descritas de Gadd45b es la regulación de la producción de IFN γ en las células T_{h1}. Existe cierta controversia acerca de si sólo la regula cuando las células son estimuladas a través del TCR o cuando se estimulan con la combinación de IL12 e IL18 (Lu y col., 2004; Yang y col., 2001).

Por último, recientemente, se ha descrito que Gadd45b controla la respuesta anti-tumoral de las células T CD8⁺, estas células requieren Gadd45b para la producción de IFN γ que es crítica para la supresión de tumores (Ju y col., 2009; Yang y col., 2011).

Estas observaciones indican que Gadd45b puede ser importante en la regulación de la respuesta inflamatoria y su desregulación podría desembocar en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. De hecho, en un modelo de encefalitis experimental autoinmune (modelo murino de la esclerosis múltiple) la deficiencia de Gadd45b hace que las células T CD4⁺ se expandan rápidamente e invadan el sistema nervioso central provocando una enfermedad más exacerbada y prolongada (Liu y col., 2005). Además la deficiencia de Gadd45b en células de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (sometidas a gran estrés fisiológico) contribuye a la activación de JNK, al empeoramiento clínico y a un aumento de la destrucción ósea (Svensson y col., 2009). Por lo tanto, la deficiencia de Gadd45b está relacionada con la aparición o el empeoramiento de enfermedades autoinmunes. Pero aún existen puntos controvertidos en cuanto a la regulación de las rutas de p38 y JNK por parte de Gadd45b.

Por último, aunque no hay ningún estudio al respecto, Gadd45b también podría regular el desarrollo de los linfocitos T en el timo puesto que, como ya se ha explicado, p38 y JNK participan en este proceso. Existen indicios de que Gadd45b podría estar implicado en la selección tímica ya que se ha visto que su expresión aumenta en modelos de ratones transgénicos de selección (Baldwin y Hogquist, 2007; DeRyckere y col., 2003; Schmitz y col., 2003).

3.4. Regulación de la función de las MAPKs

Como ya se ha mencionado en apartados anteriores, las proteínas de la familia Gadd45 son capaces de interactuar y regular la activación de las MAPKs p38 y JNK de diferentes maneras.

Introducción

Las MAPKs son proteínas que participan en las cascadas de transducción de señal que controlan diversas funciones celulares como expresión génica, mitosis, movimiento, metabolismo y apoptosis. Fosforilan serinas y treoninas específicas de ciertas proteínas diana que incluyen otras quinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto (Johnson y Lapadat, 2002). Su función y regulación se ha conservado durante la evolución desde organismos unicelulares como las levaduras hasta organismos más complejos, incluyendo los mamíferos (Widmann y col., 1999).

En las células de mamífero existen principalmente tres subfamilias de MAPKs: quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2 o p44/p42), quinasas N-terminal de c-Jun 1-3 (JNK1/JNK2/JNK3) y p38 (p38 α /p38 β /p38 γ /p38 δ). Su activación está regulada por una cascada de fosforilaciones en la que están implicadas otras quinasas (Fig. I6). Las MAPKs son el sustrato de las quinasas de MAPKs (MKK, MEK o MAP2K) que activan una MAPK específica en cada caso, las MKKs fosforilan los residuos treonina (T) y tirosina (Y) de un motivo conservado (T-X-Y) dentro del lazo de activación de las MAPK. El residuo X es diferente en cada clase de MAPK y junto con los aminoácidos que rodean el motivo T-X-Y determinan la especificidad del sustrato, ya que afectan a la disponibilidad y conformación del sitio de unión del sustrato. A su vez, las MKKs son activadas por las quinasas de MKK (MKKK, MAPKKK o MAP3K), son serin/treonin-quininas con distintos motivos en sus secuencias que hacen que se activen selectivamente ante determinados estímulos (Aouadi y col., 2006; Thalhamer y col., 2008).

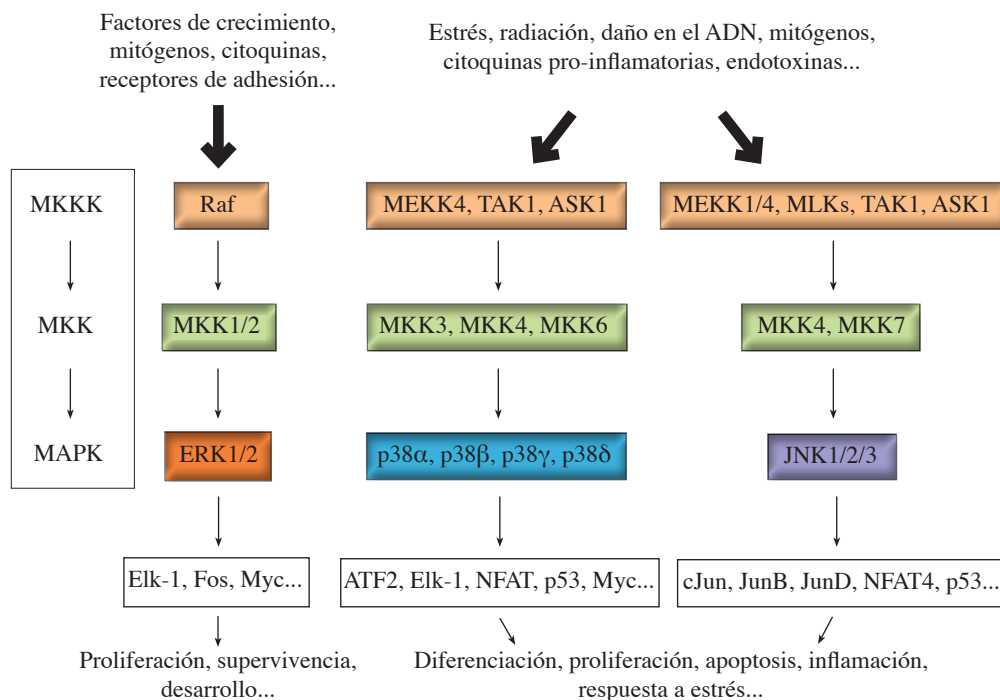


Figura I6. Ruta de activación de las MAPKs. Las tres principales subfamilias: ERK, p38 y JNK son activadas a través de una cascada que comienza con las MKKKs que activan a las MKKs, estas a las MAPKs y, finalmente, a los sustratos específicos de cada una. Se muestran algunos de los sustratos de cada ruta: Elk-1 (factor de transcripción similar a Ets), Fos, Myc (oncogen de la mielocitomatosis), ATF2 (factor de transcripción activador), NFAT, p53 y c-Jun, JunB y JunD, proteínas componentes, junto con Fos, del factor transcripcional heterodimérico AP-1.

En general, la ruta de ERK se induce por estímulos mitogénicos, por el contrario la actividad de p38 y JNK se induce por estrés ambiental y, lo que es de gran interés en inmunología, por estímulos y citoquinas pro-inflamatorias. Las rutas de p38 y JNK se activan durante la respuesta inmunológica innata y adaptativa en respuesta a receptores de antígenos (incluido el TCR; como se observa en la figura I3) y estímulos pro-inflamatorios como LPS, IL1, TGF β o TNF α (Ashwell, 2006; Rincon y Davis, 2009). Aunque los estímulos que las activan son similares ambas rutas no son redundantes si no que tienen características específicas que se detallan a continuación. Las características de la ruta de activación y la función de p38 se detallan en el apartado 4. A continuación se describe la función de JNK.

La familia JNK está compuesta por tres miembros, cada uno codificado por genes distintos: JNK1 (*Jnk1*), JNK2 (*Jnk2*) y JNK3 (*Jnk3*). Los dos primeros se expresan en células T (tienen una expresión ubicua) mientras que JNK3 se restringe al cerebro, testículos y corazón (Rincon y Pedraza-Alva, 2003). Se activan a través de la fosforilación dual en los residuos T183/Y185 por las quinasas MKK4 y MKK7 (Xia y col., 2000). La deficiencia de JNK1 o JNK2 no es letal, aunque sí lo es cuando faltan ambas (Kuan y col., 1999; Sabapathy y col., 1999b). Se han estudiado las funciones de JNK1 y JNK2 en la respuesta inflamatoria en ratones deficientes de ambas isoformas o de sus quinasas activadoras y en ratones transgénicos portadores de un versión mutante dominante negativa de JNK. Estos estudios muestran que el papel principal de JNK en las células del sistema inmunológico es regulando la función de las células T y ambas isoformas, JNK1 y JNK2, tienen funciones similares en la transducción de señal en estas células. Controlan la apoptosis de los linfocitos inmaduros en el timo y son necesarias para la activación de las células T en periferia (Behrens y col., 2001; Sabapathy y col., 1999a; Sabapathy y col., 2001). En estas células, ambas quinasas regulan la diferenciación de las células T_{h1} y T_{h2}: JNK1 favorece la diferenciación hacia T_{h1} mientras que JNK2 bloquea la diferenciación hacia T_{h2} (Dong y col., 1998; Yang y col., 1998).

La forma en que Gadd45b regula las rutas de p38 y JNK parece ser dependiente del estímulo y del tipo de tejido. Gadd45b puede regular la activación de p38 y JNK de dos formas distintas (Fig. I7):

- como ya se ha mencionado en el apartado 3.2, las proteínas Gadd45 se unen y activan a la quinasa MEKK4 que finaliza con la activación de p38 y JNK. Esta interacción también la pueden llevar a cabo los otros dos miembros de la familia Gadd45g y, con menor afinidad, Gadd45a (Miyake y col., 2007; Takekawa y Saito, 1998). En las células T, diversos estudios apuntan a que Gadd45b activa la MEKK4 ya que las células deficientes presentan menor activación de p38 y JNK (Liu y col., 2005; Lu y col., 2004), al menos cuando estas células se estimulan a través del TCR o la combinación de IL12 e IL18. Además, en células T deficientes en MEKK4 se observa una activación de p38 defectuosa y una disminución en la producción de IFN γ que se asocia con la incapacidad de Gadd45b de inducir la activación de la ruta de p38 (Chi y col., 2004). Por el contrario, la sobre-expresión de Gadd45b provoca la activación de p38 y potencia la producción de IFN γ en células T_{h1} estimuladas con IL12 e IL18 (Yang y col., 2001). También en las células

Introducción

T CD8⁺, Gadd45b parece activar la MEKK4, puesto que se ha descrito que en su ausencia la activación de p38 está disminuida (Ju y col., 2009; Yang y col., 2011)

• Por otro lado, Gadd45b interacciona e inhibe la activación de la quinasa MKK7, uniéndose directamente al sitio de unión del ATP, de este modo Gadd45b inhibe la ruta pro-apoptótica de JNK. Cuando las células T se estimulan con TNF α o agentes que provocan estrés osmótico (peróxido de hidrógeno o sorbitol) se induce la expresión de Gadd45b, a través de NF- κ B, que inhibe la activación de JNK (De Smaele y col., 2001). Gadd45b es el mediador principal en la resistencia a apoptosis inducida por NF- κ B, que es crucial en la inflamación crónica y la progresión de tumores (Papa y col., 2007; Papa y col., 2004; Papa y col., 2008).

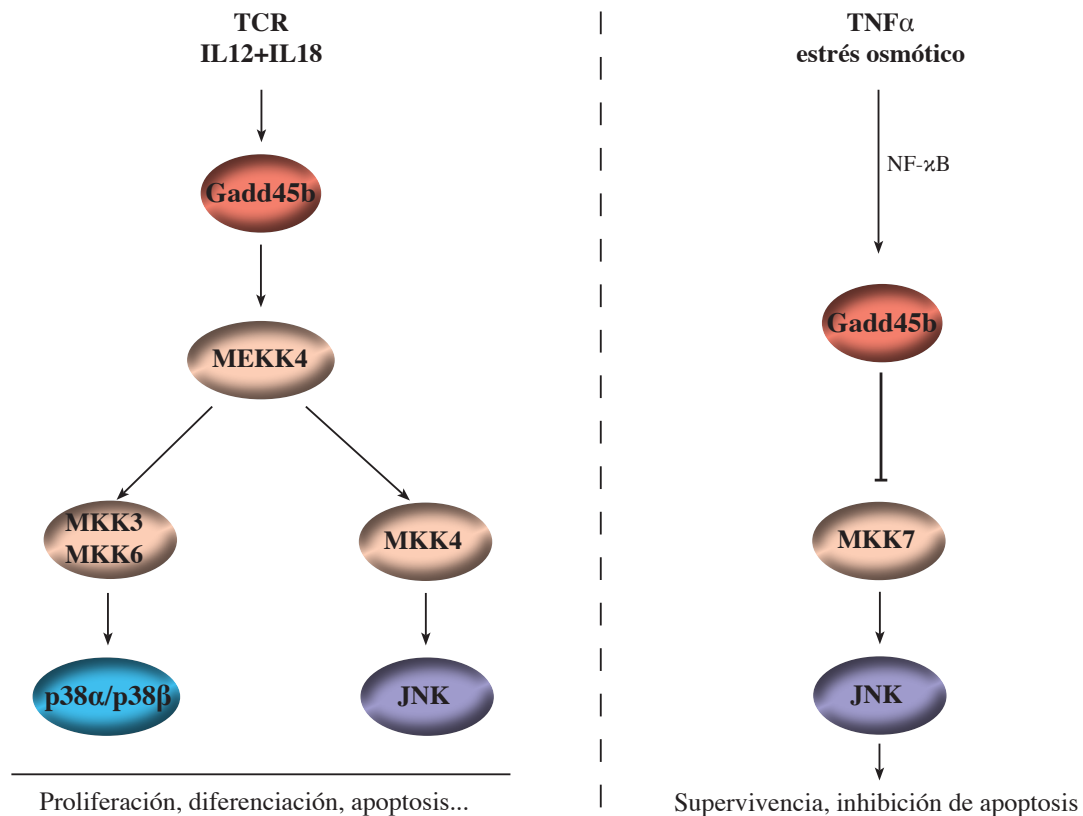


Figura I7. Regulación de las MAPK por Gadd45b en las células T. Gadd45b puede activar o inhibir las rutas de p38 y JNK dependiendo del tipo de estímulo. Tras la estimulación del TCR o con la combinación de IL12 e IL18, Gadd45b activa estas rutas a través de la quinasa MEKK4. Sin embargo, tras la estimulación con TNF α o estrés osmótico, Gadd45b puede inhibir la activación de JNK a través de la inactivación de MKK7.

4. Papel de la familia p38 en la respuesta inmunológica

4.1. La familia p38

Existen cuatro isoformas de p38, cada una codificada por un gen distinto: p38 α (*Mapk14*), p38 β (*Mapk11*), p38 γ (*Mapk12*) y p38 δ (*Mapk13*). A excepción de p38 γ , que se expresa principalmente en músculo esquelético, todas las isoformas se expresan en las células T; en estas

células p38 α es la principal pero también se expresan cantidades menores de p38 β y p38 δ (Hale y col., 1999). La familia p38 se puede dividir en dos grupos: por un lado, p38 α y p38 β y, por otro, p38 γ y p38 δ , en base a su homología, la susceptibilidad a ciertos inhibidores y a la especificidad de los sustratos (Remy y col., 2010). p38 α y p38 β tienen una homología del 74% en la secuencia de aminoácidos (Jiang y col., 1996) (95% de identidad en el sitio de unión de ATP) y fosforilan los mismos sustratos, aunque la afinidad puede diferir; por ejemplo, p38 β parece ser aproximadamente 180 veces más activo con ciertos sustratos como ATF2 (Stein y col., 1997). En adelante, para más comodidad, p38 se referirá a ambas isoformas p38 α y p38 β .

Inicialmente, p38 se identificó como un regulador de la respuesta a estrés aunque posteriormente, se vio que tiene un papel muy importante coordinando el ciclo celular y la diferenciación de distintos tipos celulares. Regula procesos como la señalización de citoquinas, la respuesta inflamatoria así como la respuesta a estrés oxidativo, a infecciones virales y sepsis, además del desarrollo embrionario, entre otras funciones. Los dos tipos de sustratos principales de p38 son factores de transcripción y otras quinasas. A nivel celular, la activación de p38 provoca diversos cambios incluyendo la regulación de la transcripción y la síntesis de proteínas, la expresión de receptores en la superficie celular, la inhibición de la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Bulavin y Fornace, 2004; Wagner y Nebreda, 2009).

La gran mayoría de los estudios se han centrado en p38 α mostrando que regula la respuesta inflamatoria de diferentes formas. Controla la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Kang y col., 2008; Lee y col., 1999), es necesaria para la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos (Arrighi y col., 2001), se activa en células B después de la estimulación del receptor (BCR), regulando la proliferación (Khiem y col., 2008), y controla el desarrollo y la función de las células T (Cook y col., 2007).

4.2. Ruta de señalización de p38 en las células T

Como se ha explicado en apartados anteriores, la activación de p38 implica una cascada de activaciones de otras quinasas. En las células T, p38 α y p38 β se activan en respuesta a la estimulación del TCR y esta activación aumenta cuando las células reciben una co-estimulación a través de CD28. Su actividad se induce a través de la fosforilación dual en los residuos T180/Y182 fundamentalmente por las quinasas MKK3 y MKK6, pero también por la MKK4, aunque esta última activa preferentemente JNK (Cook y col., 2007; Derijard y col., 1995; Raingeaud y col., 1996). La T180 y la Y182 se sitúan en el “lazo de activación” (L16), su fosforilación provoca que el lazo se mueva de modo que el sustrato tiene mejor acceso y altera la conformación del sitio catalítico hacia un estado más activo (Bellon y col., 1999; Wilson y col., 1996). La activación de p38 a través de la cascada de MAPKs se conoce como ruta clásica.

Recientemente se ha descubierto que, exclusivamente en las células T, p38 se puede activar a través de una ruta alternativa independientemente de las MAPKs. Como se observa en la figura

Introducción

I8, la estimulación del TCR recluta a la quinasa Lck que fosforila Zap70, ésta última interacciona directamente con p38 y la fosforila en la tirosina 323. Esta tirosina está presente únicamente en p38 α y p38 β . Una vez fosforilada en la Y323 p38 es capaz de homodimerizar y auto-fosforilar otras moléculas de p38 activando totalmente la quinasa. La auto-fosforilación ocurre en los residuos T180 y Y182, aunque preferentemente se produce una monofosforilación en la T180 (Mittelstadt y col., 2009). La activación de p38 a través de esta ruta está regulada negativamente por Gadd45a que evita tanto la fosforilación de la Y323 como la auto-fosforilación (Diskin y col., 2007; Salvador y col., 2005a; Salvador y col., 2005b).

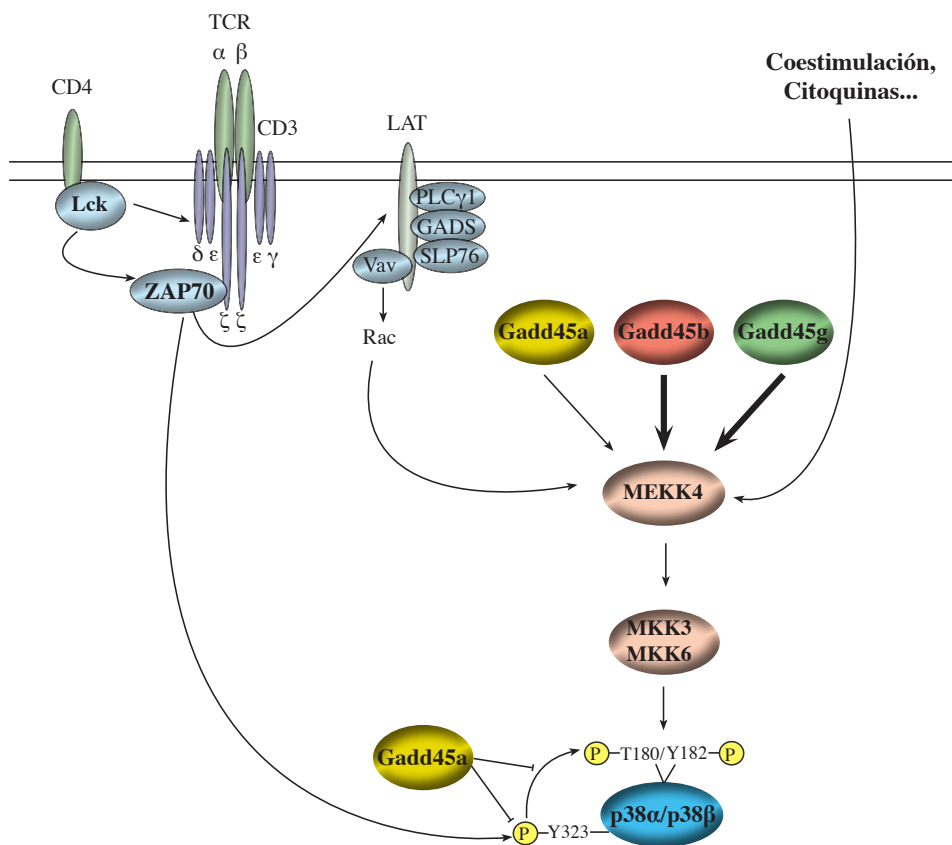


Figura I8. Rutas de señalización de p38 en células T CD4⁺. La ruta clásica, en la que está implicada la cascada de MAPKs, se activa en respuesta al TCR, co-estimulación con CD28 o citoquinas inflamatorias. Las proteínas Gadd45 la regulan positivamente a través de la interacción con la MEKK4 (mayor grosor de la flecha indica mayor afinidad). La ruta alternativa se activa exclusivamente en respuesta a la estimulación del TCR y culmina con la fosforilación de p38 en la Y323 por parte de ZAP70. La fosforilación de la Y323 y la autofosforilación de p38 está inhibida por Gadd45a.

No está claro por qué las células T poseen dos rutas de activación de p38, es posible que la activación de p38 por cada ruta implique una especificidad de sustrato distinta. Un estudio reciente con proteínas recombinantes muestra que p38 α monofosforilada en la T180 y la fosforilada en T180/Y182 tienen distinta actividad y diferente especificidad de sustrato (Mittelstadt y col., 2009).

4.3. Papel de p38 en la función de linfocitos T CD4⁺

Se ha estudiado en varias ocasiones la función de ambas isoformas: p38 α y p38 β . La deficiencia de p38 α en ratón se ha descrito por varios grupos independientes que demostraron que es letal en el embrión (Adams y col., 2000; Allen y col., 2000; Mudgett y col., 2000; Tamura y col., 2000), por lo tanto no se ha podido estudiar su función en células T de ratones deficientes. La deficiencia de p38 β , por el contrario, no es letal, un estudio con un ratón deficiente en el que se hizo una caracterización inicial mostraba una respuesta *in vivo* normal a LPS (Beardmore y col., 2005), pero no se analizó en detalle la función de los linfocitos T. La mayoría de los estudios se han hecho utilizando inhibidores químicos, que tienen efectos anti-inflamatorios *in vivo*, y con ratones portadores de versiones mutantes dominantes negativas de p38 o deficientes en alguna de sus quinasas activadoras. En las células T p38 está implicada en la regulación del desarrollo, apoptosis y función de las células efectoras:

- Desarrollo: la activación de p38 α está estrictamente regulada durante el paso de DN2 a DN4 durante el cual se produce la selección de la cadena β del TCR (Pedraza-Alva y col., 2006). También regula el proceso de selección negativa en las células DP mediante la inducción de apoptosis (Sugawara y col., 1998).

- Apoptosis: aparte del papel de p38 α en apoptosis durante el desarrollo, también está implicada en la apoptosis de las células T maduras, aunque existe cierta controversia respecto a si sólo regula este proceso en las células T CD8⁺ (Farley y col., 2006; Merritt y col., 2000) o también en las CD4⁺ (Zhang y col., 2000) (Davidson y col., 2002).

- Producción de citoquinas: p38 α modula la función de las células T_{h1} (Berenson y col., 2006; Rincon y col., 1998; Zhang y col., 2000). En células de ratón p38 α se activa selectivamente en las células T_{h1} pero no en las T_{h2} (Cook y col., 2007). La expresión de un dn-p38 α o la deficiencia en MKK3 producen una disminución en la producción de IFN γ por las células T_{h1} estimuladas a través del TCR. Por el contrario, las células T que expresan un mutante constitutivamente activo de la MKK6 muestran el efecto opuesto, un incremento en la producción de IFN γ (Rincon y col., 1998). Aunque existe cierta controversia en este punto puesto que otro estudio sugiere que p38 α regula selectivamente la producción de IFN γ inducida por citoquinas (IL12 e IL18) pero no por el TCR (Yang y col., 2001; Yu y col., 2003). Como ya se ha explicado en el apartado 4.2, en las células T p38 α y p38 β se activan también por una ruta alternativa a través de la fosforilación de la Y323 en respuesta a la estimulación del TCR (Ashwell, 2006; Mittelstadt y col., 2005; Salvador y col., 2005b). El tratamiento con SB203580 inhibe la producción de citoquinas inducida por la estimulación del TCR (Rincon y col., 1998), pero es difícil saber la contribución de p38 α y p38 β en estos efectos basándose solo en el uso del inhibidor. En un estudio reciente se reemplazó la Y323 de p38 α y p38 β por una fenilalanina (P), de modo que se bloquea la activación por la ruta alternativa, las células T de estos ratones transgénicos (*Knock In-KI*) sufren una ligera reducción en la producción IFN γ comparado con las células wt (Jirmanova y col., 2011; Jirmanova y col., 2009), sugiriendo, por primera vez, un posible papel de ambas isoformas en la función de las

células T.

Cada vez hay más evidencias que indican un papel crítico de p38 en la función de las células T. La principal limitación de los inhibidores es que son menos específicos de lo que se pensó en un principio; por ejemplo, el más usado (SB203580) inhibe tanto p38 α como p38 β , pero se ha visto que también inhibe otras quinasas como Raf (Hall-Jackson y col., 1999), RICK, GAK y CK1 (Godl y col., 2003), además al inhibir ambas isoformas no permite el estudio de funciones específicas de cada una. Lo mismo ocurre con los ratones deficientes en las quinasas activadoras de p38, no permiten diferenciar las funciones exactas de cada isoforma. En el caso de los ratones portadores de la versión dominante negativa (dn-p38 α) sigue existiendo un porcentaje muy alto de expresión de la proteína endógena. Aunque se ha estudiado durante años, la función exacta de p38 α y p38 β en proliferación, apoptosis y producción de citoquinas en estas células sigue siendo controvertida.

4.4. Aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de p38

Se ha considerado la utilización de inhibidores de p38 en diversas enfermedades con componente inflamatorio como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, aterosclerosis o psoriasis, entre otras. Recientemente se ha descrito que la ruta alternativa de p38 se encuentra hiper-activada en las células T de pacientes de artritis reumatoide (Lopez-Santalla y col., 2011). Además el bloqueo de esta ruta elimina la aparición espontánea de autoinmunidad en los ratones deficientes en Gadd45a (Jirmanova y col., 2011).

Se han desarrollado un gran número de inhibidores de p38 α y p38 β , la mayoría son competidores por el sitio de unión de ATP, uno de los mejor caracterizados es el SB203580, un compuesto pirimidil imidazol que evita la unión del ATP y, con ello, la activación de p38 α y p38 β . La administración de este compuesto tiene efectos beneficiosos en modelos murinos, como la artritis inducida por colágeno, donde inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Ashwell, 2006) (Badger y col., 1996; Cuadrado y Nebreda, 2010). Alguno de esos compuestos se han conseguido usar como anti-inflamatorios, cuando la administración era ectópica o por un tiempo corto, pero la mayoría son descartados durante los ensayos clínicos. Esto es debido a que su uso tiene efectos adversos importantes, principalmente en el hígado y el sistema nervioso central (Cohen, 2009).

El estudio y desarrollo de los inhibidores de p38, junto con los resultados obtenidos con modelos genéticos, han puesto de manifiesto la necesidad de profundizar en los mecanismos de señalización implicados en la producción de citoquinas y el proceso inflamatorio, así como la aportación específica de cada isoforma de p38.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es conocer el papel de Gadd45b en el mantenimiento de la tolerancia central y periférica del sistema inmunológico a través de la modulación de las quinasas p38 α y p38 β siguiendo los siguientes objetivos concretos:

- 1. Estudiar el papel de Gadd45b como regulador de p38 α y p38 β en la función de las células T CD4 $^{+}$.**
 - 1.1. Analizar el fenotipo inmunológico y la patología de los ratones deficientes en Gadd45b.
 - 1.2. Estudiar el papel de Gadd45b, p38 α y p38 β durante la activación de las células T CD4 $^{+}$: proliferación y apoptosis.
 - 1.3. Estudiar el papel de Gadd45b, p38 α y p38 β en la diferenciación y producción de citoquinas de las células T CD4 $^{+}$ efectoras.

- 2. Estudiar el papel de Gadd45b durante el desarrollo de las células T.**
 - 2.1. Estudiar la función de Gadd45b durante el proceso de selección tímica.
 - 2.2. Analizar el papel de Gadd45b en la señalización de las MAPKs en el timo.



MATERIALES
MATERIALES
Y MÉTODOS
Y MÉTODOS

1. Modelos murinos

Este trabajo ha sido realizado con ratones deficientes en *Gadd45b*, *p38α* y *p38β*.

1.1. Ratones deficientes en *Gadd45b*

Los ratones *Gadd45b*^{-/-} se generaron en el laboratorio del Dr. Albert Fornace según se describe en (Gupta y col., 2005) en un fondo genético mixto C57BL/6, 129Sv. La delección de *Gadd45b* se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN extraído de colas de ratón (ver apartado 1.3). Los animales se mantuvieron en el animalario del CNB bajo condiciones libres de patógenos. Los experimentos realizados con estos ratones están aprobados por el Comité de Ética del CNB y se llevaron a cabo dentro de los estándares de la Unión Europea.

1.2. Ratones deficientes en *p38α* y *p38β*

Los ratones deficientes en *p38α* se generaron en el laboratorio del Dr. Ángel Nebreda según se describe en (Ventura y col., 2007). Se trata de un modelo deficiente condicional inducible por tamoxifeno en el que el gen de *p38α* está flanqueado por dos secuencias loxP que son reconocidas por la recombinasa Cre. El gen de la recombinasa (*RERTn*) está fusionado con un dominio de unión del receptor de estrógenos que está mutado, de tal manera que es reconocido por tamoxifeno pero no por estrógenos. Después de la inyección de tamoxifeno se activa la recombinasa Cre que reconoce los sitios loxP escindiendo el fragmento que se encuentra entre estos.

Los ratones deficientes en *p38β* se generaron en el laboratorio del Dr. Simon Arthur según se describe en (Beardmore y col., 2005).

Para la generación de los ratones dobles deficientes en *p38α* y *p38β* se cruzaron ratones *p38α*^{lox/lox}*RERTn*^{ERT/ERT} con ratones *p38β*^{-/-} (Beardmore y col., 2005). Los ratones tienen un fondo genético mixto C57BL/6, 129Sv y CD1. Los distintos genotipos:

p38α^{lox/lox} *RERTn*^{ERT/ERT} *p38β*^{+/+} (wt y *p38α*^{lox/lox})

p38α^{lox/lox} *RERTn*^{ERT/ERT} *p38β*^{-/-} (*p38β*^{-/-} y *p38α*^{lox/lox} *p38β*^{-/-})

se obtuvieron cruzando entre sí ratones *p38α*^{lox/lox}*RERTn*^{ERT/ERT}*Mapk11*^{+/-}. Para conseguir la eliminación del gen *p38α* y generar los genotipos deficientes en *p38α* (*p38α*^{ΔΔ} y *p38α*^{ΔΔ}*p38β*^{-/-}) se activó la recombinasa Cre con inyecciones intraperitoneales de hidroxitamoxifeno (OHT-Sigma). De tal manera que se inyectaron ratones

p38α^{lox/lox} *RERTn*^{ERT/ERT} *Mapk11*^{+/+} para obtener ratones *p38α*^{ΔΔ}

p38α^{lox/lox} *RERTn*^{ERT/ERT} *Mapk11*^{-/-} para obtener ratones *p38α*^{ΔΔ}*p38β*^{-/-}

de 6 a 8 semanas de edad con OHT (1mg/día durante 5 días consecutivos) disuelto en aceite de sésamo (Sigma) que se preparó sonicando hasta la disolución completa; además se les suministró tamoxifeno en la dieta (Tekland CRD TAM400) durante el estudio.

Materiales y métodos

La delección de p38 α se confirmó en células de sangre periférica en cada experimento por western blot (wb). Se extrajo la sangre mediante punción de la vena submaxilar y se seleccionaron las células mononucleares después de una centrifugación con Ficoll-Paque (GE Healthcare) durante 30 min a 2000 rpm a temperatura ambiente. Las células se lisaron y se analizó la eliminación de p38 α por wb con un anticuerpo anti-p38 α como se explica en el apartado 6.

La delección de p38 β se confirmó por PCR (Beardmore y col., 2005) a partir de ADN extraído de colas de ratón (ver apartados 1.3). Los ratones se mantuvieron en el animalario del CNIO y los experimentos realizados están aprobados por el Comité de Ética del CNIO y se llevaron a cabo dentro de los estándares de la Unión Europea.

1.3. Extracción de ADN y genotipaje de los ratones

Para el genotipaje de los ratones se cortó un fragmento de aproximadamente 0,5 cm de la cola de ratones recién destetados (alrededor de 21 días de edad). Las colas se mantuvieron a -20°C o se procesaron inmediatamente incubándolas en 100 μ l de solución de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH=8,5; EDTA 5 mM; SDS 0,2%; NaCl 200 mM) suplementado con proteinasa K (100 μ g/ml, Roche). Esta solución se incubó durante la noche a 55°C. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 14.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo con 300 μ l de agua destilada y, finalmente, las muestras se hirvieron durante 10 min a 100°C.

Para el genotipaje de los ratones Gadd45b^{-/-} se utilizó el método de PCR. La mezcla de reacción se preparó en un volumen total de 25 μ l conteniendo 10 μ l de Taq PCR Mix 2,5X (Sigma), MgCl₂ 1,5 mM y los oligonucleótidos correspondientes (la secuencia y concentración se muestran en la tabla M1). Por último se añadieron 2 μ l de ADN y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La mezcla se procesó en una máquina de PCR (iCycler, Bio-Rad) siguiendo el siguiente programa:

1. Desnaturalización	94°C, 3 min
2. Desnaturalización	94°C, 1min
3. Anillamiento	61°C, 30 s
4. Elongación	72°C, 2 min
5. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron durante 35 ciclos	
6. Elongación	72°C, 3 min
7. Pausa	4°C

La mezcla de reacción para el genotipaje de los ratones p38 α ^{lox/lox}, RERT-Cre y p38 β ^{-/-} se preparó en un volumen total de 20 μ l conteniendo 8 μ l de Taq PCR Mix 2,5X (Sigma) y los oligonucleotidos correspondientes (la secuencia y concentración se muestran en la tabla M1). Por

último se añadieron a la reacción 2 µl de ADN y agua destilada hasta alcanzar el volumen final. La mezcla se procesó siguiendo el siguiente programa:

1. Desnaturalización	94°C, 5 min
2. Desnaturalización	94°C, 30 s
3. Anillamiento	60°C, 30 s
4. Elongación	72°C, 30 s
5. Los pasos 2,3 y 4 se repitieron durante 35 ciclos	
6. Elongación	72°C, 10 min
7. Pausa	4°C

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en las distintas PCRs, así como la concentración final en la mezcla de reacción y el tamaño de los fragmentos generados se muestran en la tabla M1.

Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa (EuroClone) al 2% disuelta en tampón TAE 1X (para obtener TAE 1X se diluyó con agua destilada TAE 50X: 242 g de Tris, 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M pH=8). Para poder visualizar el ADN en el gel se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Cada muestra de ADN se mezcló con tampón de carga 6X (Ficoll 15%, xilencianol 0,25% azul de bromofenol 0,25%) y se cargó en el gel para su separación mediante electroforesis a 80-120 V. También se cargó en el gel un patrón de pesos moleculares conocidos (100 bp Ladder, Favorgen). El ADN con bromuro de etidio intercalado se visualizó con luz UV a 254 nm.

	Secuencia (concentración)		Fragmento amplificado
	5'-TGT GGA GCC AGG AGC AGC A-3' (0,5 μM)	5'-GCA AGC GAT CTG TCT TGC TCA-3' (1 μM)	wt (254 bp)
Gadd45b	5'-GCA TGC TCC AGA CTG CCT T-3' (0,5 μM)	5'-GCA AGC GAT CTG TCT TGC TCA-3' (1 μM)	delecionado (130 bp)
p38α	5'-CTA CAG AAT GCA CCT CGG ATG-3' (0,6 μM)	5'-AGA AGG CTG GAT TTG CAC AAG-3' (0,6 μM)	wt (121 bp) sitios lox incorporados (188 bp)
	5'-GCA TCT CTG GAG CTC TGT GAG AGG-3' (0,6 μM)	5'-GGA GAC TAT CAG TCT GCC AAC CC-3' (0,6 μM)	wt (220 bp)
p38β	5'-TGA CCG CTT CCT CGT GCT T-3' (0,6 μM)	5'-GGA GAC TAT CAG TCT GCC AAC CC-3' (0,6 μM)	delecionado (450 bp)
RERT-Cre	5'-CCA GAT GAC AGC GAT GAG GA-3' (0,85 μM)	5'-CCT CTC TGA GCC TCA ATT AAG CAG-3' (0,85 μM)	wt (480 bp)
	5'-TGA GTA ACAAAG GCA TGG AGC A-3' (0,3 μM)	5'-CCT CTC TGA GCC TCA ATT AAG CAG-3' (0,85 μM)	RERT-Cre insertada (390 bp)

Tabla M1. Oligonucleótidos utilizados para el genotipaje de los ratones. Se muestra la secuencia y la concentración (μM) de cada nucleótido, así como el fragmento que amplifican del alelo correspondiente (wt: tipo silvestre).

2. Análisis por citometría de flujo

2.1. Estudio del fenotipo inmunológico

Los ratones se sacrificaron en una cámara de hipoxia con CO₂, se extrajeron los nódulos linfoides, el bazo y el timo y se mantuvieron a 4°C en medio completo RPMI 1640 (Gibco BRL) suplementado con glutamina 4 mM (Lonza), β-mercaptoetanol 0,5 μM (Merck), penicilina/estreptomicina 100 U/ml (Lonza) y 10% de suero fetal bovino (FCS, EuroClone). Los órganos se disgregaron utilizando filtros de nylon de un tamaño de poro de 40 μm (BD Falcon). Las suspensiones celulares se centrifugaron durante 5 min a 1.200 rpm a 4°C y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS: fosfato sódico 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM).

Anticuerpo	Conjugado	Compañía	Clon	Origen	Isotipo	Dilución
B220	PerCP	BD Pharmingen	RA3-6B2	rata	IgG2a, κ	1/200
CD3	APC	eBioscience	145-2C11	hámster	IgG	1/50
CD4	APC	eBioscience	GK1.5	rata	IgG2b, κ	1/200
CD4	PerCP	Biolegend	GK1.5	rata	IgG2b, κ	1/100
CD8a	PE	Beckman Coulter	53-6.7	rata	IgG2a	1/100
CD8a	PerCP	BD Pharmingen	53-6.7	rata	IgG2a, κ	1/100
CD25	PE	BD Pharmingen	7D4	rata	IgG1, κ	1/100
CD44	FITC	Beckman Coulter	KM201	rata	IgG1, κ	1/100
CD62L	APC	Ebioscience	MEL-14	rata	IgG2a, κ	1/50
Foxp3	FITC	eBioscience	FJK-16s	rata	IgG2a, κ	1/50
TCRαβ	FITC	BD Pharmingen	H57-597	hámster	IgG2, λ1	1/100

Tabla M2. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo. Se muestra el fluorocromo conjugado, así como la compañía, clon, especie de origen, isotipo y dilución utilizada en cada caso. APC: alofocianina, FITC: fluoresceína, PE: ficoeritrina y PerCP: clorofila peridina.

Para el análisis de marcadores de la superficie celular se incubaron 5x10⁵ células en una placa de 96 pocillos con fondo en V (Nunc) con los anticuerpos conjugados con fluorocromos a la dilución apropiada (tabla M2) en 30 μl de PBS frío durante 30 min a 4°C, en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se procesaron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) inmediatamente o se fijaron con formaldehído 0,1% y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento. Se analizó un mínimo de 20.000 células por muestra excluyendo las células muertas. El análisis de los resultados se realizó mediante los programas Cytomics (CXP) y FlowJo (TreeStar Inc.).

Materiales y métodos

2.2. Estudio por citometría de flujo de las células T_{reg}

Para estudiar la población de células T_{reg} se hizo una primera tinción como se indica en el apartado 2.1 de los marcadores CD3-APC, CD4-PerCP y CD25-PE. Después se procedió a la tinción del marcador intracelular Foxp3 característico de las células T_{reg}, en primer lugar se incubaron las células con 100 µl de la solución de fijación/permeabilización (eBioscience) durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavó una vez con tampón de permeabilización (eBioscience), a continuación, se incubaron las células con el anticuerpo frente a Foxp3 conjugado con FITC (tabla M2) en 100 µl de tampón de permeabilización durante 30 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, las muestras se lavaron dos veces con tampón de permeabilización, se resuspendieron en 300 µl de PBS y se procesaron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). Se analizó un mínimo de 20.000 células por muestra, excluyendo las células muertas. Para el análisis de los resultados se utilizaron los programas Cytomics (CXP) y FlowJo (TreeStar Inc.).

3. Cultivos celulares y ensayos funcionales

3.1. Aislamiento y cultivo de células T CD4⁺

Se extrajeron los nódulos linfoides y el bazo de cada ratón como se describe en el apartado 2.1. Se purificaron células T CD4⁺ mediante selección negativa en columnas de cromatografía de afinidad (Cedarlane) según las instrucciones del fabricante. Se incubaron aproximadamente 10⁸ células (a una concentración de 2x10⁷ células/ml) durante 20 min a 4°C en PBS suplementado con FCS (2%) y un cóctel de anticuerpos que incluye anti-CD8, anti-MAC1 y anti-B220 que permite eliminar las células T CD8⁺, los granulocitos y las células B, respectivamente, a su paso por la columna. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS/FCS 2% , se resuspendieron las células en una concentración final de 5x10⁷ células/ml y se cargaron en la columna dejando que las células pasen a través de ella por gravedad. La columna lleva acoplados anticuerpos anti-IgG, de modo que las células marcadas con alguno de los anticuerpos anteriormente mencionados quedan secuestradas, permitiendo el paso principalmente de las células T CD4⁺ y obteniendo una pureza del 90-95%. Las células purificadas se cultivaron en medio completo, a menos que se indique otra condición, en un incubador en condiciones estándar de humedad (95%), temperatura (37°C) y CO₂ (5%).

3.2. Ensayos de proliferación

Se cultivaron 10⁵ células de nódulos linfoides o células T CD4⁺ purificadas en cada pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Nunc) y se estimularon con concentraciones crecientes de los siguientes mitógenos: anti-CD3 (BD Pharmingen), pegado a placa, Concanavalina A (ConA, SIGMA) e IL2 (obtenida y purificada del medio condicionado de linfocitos de ratón), ambos solubles. Para pegar a la placa el anti-CD3 se resuspendió en PBS a la concentración deseada en cada caso y se incubó durante 1 h a 37°C; posteriormente, se lavó la placa con PBS 3 veces.

Cuando las células se estimulan con anti-CD3, además, se añaden al medio $0,5 \times 10^5$ APCs por pocillo (esplenocitos irradiados; dosis 20 Greys). Después de 48 h de activación con anti-CD3 o ConA, se añadió a cada pocillo $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina (Amersham Biosciences) y se mantuvieron en cultivo durante 16 h. En el caso de la activación con IL-2, las células se cultivaron durante 6 días, antes de añadir la ^3H -timidina. Al final del ensayo, se filtraron las muestras por medio de un harvester (Perkin Elmer) pasándolas a través de una membrana de fibra de vidrio (Wallac). Para evaluar la incorporación de timidina (representada por las cuentas por minuto: cpm) se bañó en 5 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se analizó en un contador de centelleo (Trillux 1450 Microbeta, Wallac). Cada muestra se hizo por triplicado y se consideró la media como resultado final.

Cuando se indica, las células T CD4^+ se tiñeron con carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE, $2 \mu\text{M}$, Molecular Probes) incubando 4×10^6 células/ml durante 10 min a 37°C , posteriormente, se lavaron con PBS y se estimularon 10^6 células por pocillo con anti-CD3 y anti-CD28 (BD Pharmingen), pegados a placa, durante 72 h en una placa de 24 pocillos (Falcon). Antes del análisis por citometría, se incubaron las células con $2,5 \mu\text{g/ml}$ de yoduro de propidio (IP), de tal forma que sólo en las células vivas (IP negativas) se analizó la fluorescencia del CFSE con un citómetro FACSCalibur.

3.3. Ensayos de muerte celular

Para el ensayo de apoptosis inducida por activación se cultivaron 5×10^5 células T CD4^+ por pocillo, en una placa de 48 pocillos (Falcon), y se dejaron sin estímulo durante 24 o 48 h o se activaron con ConA ($10 \mu\text{g/ml}$) soluble durante 24 h.

Por otro lado, se estimularon 5×10^5 células T CD4^+ con anti-CD3 ($5 \mu\text{g/ml}$), pegado a placa, en presencia de $2,5 \times 10^5$ APCs. Después de 48 h, las células se lavaron con PBS y se contaron; 5×10^5 células por pocillo se re-estimularon con anti-CD3 ($10 \mu\text{g/ml}$) o ConA soluble durante 24 o 48 h. Finalmente, se recogieron las células, se lavaron con PBS frío y se fijaron con etanol al 70% a -20°C , las muestras se conservaron a esta temperatura hasta el día del análisis.

Para el ensayo de apoptosis inducida por FasL, se cultivaron 10^6 células T CD4^+ por pocillo, en una placa de 24 pocillos (Falcon), y se incubaron durante 24 h con FasL recombinante soluble (FLAG-tagged, 100 ng/ml , Alexis) y anticuerpo M2-anti-FLAG ($1 \mu\text{g/ml}$, SIGMA). Finalmente, se recogieron las células, se lavaron y fijaron.

El día del análisis se lavaron las células dos veces con PBS y se tiñeron con 1 ml de IP (DNA prep Reagents Kit; Beckman Coulter) durante 30 min a 37°C . Se analizó un mínimo de 10.000 células por muestra, en un citómetro XL-MCL (Beckman Coulter) o en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

Materiales y métodos

3.4. Diferenciación de células T CD4⁺ hacia T_{h1} y T_{h2} y ensayo de producción de citoquinas

Para la diferenciación de células T CD4⁺ hacia células efectoras T_{h1} o T_{h2} se purificaron células T CD4⁺, según se explica en el apartado 3.1, y se cultivaron en medio completo 10⁵ células por pocillo en una placa de 96 pocillos (Falcon) en la que previamente se había pegado anti-CD3 (10 µg/ml) y anti-CD28 (5 µg/ml).

Para las condiciones de diferenciación a T_{h1}, se suplementó el medio con IL12 (2 ng/ml, Sigma), IL2 (10% del sobrenadante obtenido y purificado del medio condicionado de linfocitos de ratón) y anti-IL4 (10 µg/ml, clon 11B11, BD Pharmingen). Después de 5 días, se lavaron las células con PBS y se contaron. Para inducir la producción de citoquinas, se re-estimularon 10⁵ células por pocillo durante 12 h con anti-CD3 (5 µg/ml) solo o combinado con anti-CD28 (5 µg/ml), pegados a placa, o con una combinación de IL12 (3,4 ng/ml) e IL18 (10 ng/ml, Sigma).

Para las condiciones de diferenciación a células T_{h2}, el medio se suplementó con IL4 (10 ng/ml, Sigma), IL2 (10%) y anti-IL12 (10 µg/ml, Sigma). Después de 5 días en cultivo, las células se lavaron y contaron. Para inducir la producción de citoquinas, se re-estimularon 10⁵ células por pocillo con anti-CD3 (5 µg/ml) pegado a placa durante 6 o 12 h.

Posteriormente, los sobrenadantes de cultivo se recogieron a las horas indicadas para determinar la concentración de citoquinas producidas incubándolos con el kit de Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Immunoassay (Millipore). Este kit está formado por microesferas que llevan anclados dos fluorocromos distintos en diferente proporción, específica para cada citoquina a medir. Así la primera de las microesferas tendrá un 100% del primer fluorocromo y 0% del segundo, la segunda microesfera tendrá un 99% del primer fluorocromo y 1% del segundo, la tercera tendrá un 98% del primer fluorocromo y 2% y así sucesivamente. De este modo al hacerlas pasar por una corriente de flujo, en un Luminex 100 IS, cada una es clasificada en función al patrón de fluorescencia. Además, cada microesfera lleva acoplado covalentemente un anticuerpo específico de la citoquina a medir. Este método permite analizar un número elevado de citoquinas dentro de una misma muestra en un volumen muy pequeño (25 µl). Se utilizó el estándar proporcionado por el kit como patrón de concentraciones desde 10000 pg/ml hasta 3,2 pg/ml. Brevemente, en una placa de 96 pocillos (Millipore) se mezclan 25 µl del estándar o de la muestra, 25 µl tampón de ensayo (sólo en las muestras), 25 µl de matriz de suero (antisuero) y 25 µl de la mezcla de microesferas. Se incubó durante la noche a 4°C, se lavó dos veces con tampón de lavado (proporcionado por el kit) y se añadieron 25 µl de la mezcla de anticuerpos específicos de cada citoquina. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, se añadieron 25 µl de estreptavidina-ficoeritrina y se volvió a incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó dos veces con tampón de lavado y se añadieron 150 µl de fluido envolvente (Sheath fluid) y se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MFI) en el Luminex. Se hizo un duplicado de cada muestra, cada una con dos diluciones distintas para asegurar la detección de todas las citoquinas y se consideró la media como resultado final.

Parte de las células T_{h1} diferenciadas se dejaron en reposo en el incubador durante la noche,

posteriormente, se estimularon a una concentración de 3×10^6 células/ml con $5 \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 soluble durante distintos tiempos, usando como “crosslinker” anti-IgG1 (BD Pharmingen) a la misma concentración. Por último, se analizó la señalización de MAPK por western blot (wb) como se indica en el apartado 6.

3.5. Activación *in vitro* de timocitos

Se extrajo el timo de ratones de 5 a 8 semanas de edad y se disgregó utilizando filtros de nylon de $40 \mu\text{m}$. Los timocitos se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de FCS, glutamina 4 mM , β -mercaptoetanol $0,5 \mu\text{M}$ y penicilina/estreptomicina 100 U/ml . Las células se dejaron en reposo a 37°C durante al menos 4 h, después se concentraron y activaron 3×10^6 células por ml con anti-CD3 soluble ($0,5$ o $10 \mu\text{g/ml}$) en combinación con anti-IgG1 ($0,5$ o $10 \mu\text{g/ml}$) durante 15, 30 o 60 min a 37°C . Posteriormente, las células se recogieron, se lavaron con PBS frío, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min a 4°C y se lisaron inmediatamente para su posterior análisis por wb (ver apartado 6) o se mantuvieron a -80°C hasta el día del análisis.

3.6. Activación *in vivo* de timocitos

Para los estudios *in vivo*, ratones de 6 a 8 semanas de edad recibieron una inyección intraperitoneal de PBS o $100 \mu\text{g}$ de anti-CD3 (producido por el hibridoma 2C11 y purificado en condiciones estériles). Los ratones se sacrificaron a las 24 h después de la inyección, se les extrajo el timo, se disgregó y los timocitos se resuspendieron en medio completo. 5×10^5 timocitos se utilizaron para analizar por citometría de flujo las poblaciones en base a la expresión de los marcadores CD4 y CD8, como se explica en el apartado 2.1, así como la muerte inducida mediante tinción con Anexina V. Para el análisis de la apoptosis, se lavaron las células con PBS frío y se diluyeron en $100 \mu\text{l}$ de tampón de unión (Hepes/NaOH 10 mM pH 7,4; NaCl 140 mM ; CaCl_2 $2,5 \text{ mM}$). A continuación, se añadieron $2 \mu\text{l}$ de Anexina V conjugada con FITC (Bender MedSystems) y se incubaron durante 15 min a 4°C , en oscuridad. Posteriormente, se añadieron $300 \mu\text{l}$ de tampón de unión y se analizaron inmediatamente un mínimo de 20.000 células por muestra en un citómetro XL-MCL (Beckman Coulter). Se calculó el porcentaje de muerte específica como:

$$\% \text{ muerte específica} = \left(\frac{\% \text{ células vivas PBS} - \% \text{ células vivas anti-CD3}}{\% \text{ células vivas control wt PBS}} \right)$$

El resto de células se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min a 4°C y se lisaron inmediatamente o se mantuvieron a -80°C para, posteriormente, estudiar la señalización celular por wb (ver apartado 6).

Materiales y métodos

4. Análisis de auto-anticuerpos por ELISA

Para la determinación de la presencia de auto-anticuerpos se utilizó sangre extraída con capilares heparinizados (Brand) del plexo venoso retro-orbital de los ratones de más de 12 meses de edad. La sangre se recogió en tubos Microtainer para suero (BD) que se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min, posteriormente se recogió el suero y se congeló a -20°C hasta el día del análisis.

Mediante ELISA se determinó la presencia de anticuerpos frente a ss-ADN (ADN de timo de ternera, SIGMA, desnaturalizado durante 10 min a 100°C), ds-ADN (ADN de timo de ternera tratado con 200 U/ μ l de nucleasa S1, SIGMA, durante 1 h a 37°C) e histonas (tipo II-S, una mezcla de histonas H2A, H2B, H3, y H4, de timo de ternera, SIGMA). Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (Nunc Immuno plates), cada pocillo se cubrió con 100 μ l de poli-L-lisina 2,4 μ g/ml (SIGMA) durante 1 h a 37°C. Después se lavaron 3 veces con 200 μ l de PBS/Tween20 0.05% (PBS/T) y se añadieron 50 μ l (10 μ g/ml preparado en PBS) de ss-ADN, ds-ADN o histonas y se incubó durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 3 veces con PBS/T y se añadieron las muestras de suero en diluciones crecientes 1:10; 1:50; 1:250; 1:1250; 1:6250 en PBS/T suplementado con 5% de FCS. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 h y se lavaron 3 veces con PBS/T. Posteriormente se añadieron 50 μ l de IgG específico de ratón conjugado con HRP (peroxidasa de rábano, 1:2000 en PBS/T; DAKO cytomation), tras 1 h a temperatura ambiente se lavaron 5 veces con PBS/T y se procedió al revelado usando como sustrato de la HRP tabletas SigmaFast OPD (100 μ l por pocillo de una solución preparada con 2 tabletas diluidas en 20 ml de agua destilada/H₂O₂ 1:2000). Después de 5 min, se paró la reacción añadiendo a cada pocillo 50 μ l de H₂SO₄ 3 M y se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas (Titertek Multiskan). Para cada ensayo se utilizó como control positivo suero procedente de ratones lpr que presenta alto contenido en auto-anticuerpos.

5. Histopatología e inmunohistoquímica

En todos los análisis se utilizaron ratones de más de 12 meses de edad. Para analizar la histopatología, se extrajeron los tejidos y se fijaron en formalina tamponada al 10% (SIGMA); posteriormente, fueron embebidos en parafina y seccionados en cortes de 4 μ m de espesor. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina/eosina y analizadas al microscopio (Olympus Vanus AHBS3) por la Dra. Juana Flores (Universidad Complutense de Madrid). La principal observación fue la aparición de glomerulonefritis en el riñón de los ratones deficientes en Gadd45b. En cada una de las muestras, el grado de severidad de glomerulonefritis fue evaluado en una escala de 0 a 4 de acuerdo a (Berden y col., 1983).

También se tomaron muestras de orina en las que se evaluó la presencia y concentración de proteínas utilizando las tiras reactivas Multistix 10 SG (Bayer). Se puso una gota de cada muestra en contacto con el área reactiva correspondiente y tras 1 min, se determinó la presencia, así como

la concentración de proteínas (trazas = 0; + = 30; ++ = 100; +++ = 300; ++++ = 2000 mg/dl), en función del color de la tira reactiva.

Por último, se analizó el depósito de inmunocomplejos en los glomérulos renales. Los riñones se incluyeron en medio de congelación (Jung) y se congelaron en nitrógeno líquido. Posteriormente se realizaron secciones con ayuda de un criostato (Leica). Estas secciones se fijaron en acetona fría durante 10 min y se dejaron secar totalmente a temperatura ambiente. Después se bloquearon con PBS/BSA (2%)/FCS (10%) durante 45 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG conjugado con FITC (Beckman Coulter) diluido en PBS/suero de cabra (2,5%) durante la noche a 4°C. Finalmente, se lavaron con PBS, se montaron con medio Vectashield (Vector Labs) y se analizó la presencia de inmuno-complejos utilizando un microscopio confocal (Olympus).

6. Preparación y análisis de proteínas por wb

6.1. Preparación de extractos celulares totales

Las células se lisaron con el tampón de lisis de Cell Signaling (tampón 1X: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Na₂EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton 1%, pirofosfato sódico 2,5 mM, β-glicerofosfato 1mM, ortovanadato sódico 1mM y leupeptina 1 μg/ml) a razón de 10 μl por cada millón de células, centrifugando durante 10 min a 14.000 rpm a 4°C. Se cuantificó la cantidad de proteínas en el extracto utilizando el kit Micro BCA (Termo Scientific), este método utiliza el ácido bicinonínico (BCA) para la detección de Cu¹⁺, que se forma al reducirse el Cu²⁺ en un ambiente alcalino, de manera que el producto final de la reacción (dos moléculas de BCA con un ión Cu¹⁺) es de un color púrpura que se puede detectar midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm (Smith y col., 1985). En primer lugar, se mezclaron los reactivos A, B y C a razón de 50/49/1 y se incubaron 100 μl de esta mezcla con 1 μl de lisado en una placa de 96 pocillos con fondo plano (Nunc) durante 30 min a 37°C. A la vez, se incluyeron pocillos con concentraciones conocidas y crecientes de albúmina de suero bovino (BSA) como patrón. Finalmente, se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de placas (Sunrise, Tecan).

6.2. Análisis de proteínas por wb

Se preparó una cantidad igual de proteína de todas las muestras (siempre superior a 15 μg) y se desnaturizó con tampón de carga 4X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 8%, glicerol 40%; Ditiotretitol 1 M; β-mercaptoetanol 4%; azul de bromofenol 0,1%) durante 5 min a 95°C. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) de 1 mm al 10% o 12,5% de acrilamida, preparado según el protocolo de Laemmli (tabla M3), en tampón de electroforesis 1X (preparado diluyendo en agua destilada tampón 10X: Tris 24,8 mM; glicina 195 mM; SDS 10 %).

Materiales y métodos

La electroforesis se llevó a cabo usando el sistema Mini Protean II (Bio-Rad) a 100-120 V durante 1-1,5 h. Para estimar el peso molecular de las proteínas se utilizó un marcador de pesos conocidos, comprendidos entre 12 y 225 KDa (Full-Range Rainbow Marker, Amersham).

	Gel de resolución		Gel de concentración
concentración final de acrilamida	10%	12,5%	3,75%
acrilamida-bisacrilamida (29:1)	3,333 ml	4,166 ml	0,625 ml
TrisHCl (0,5 M)	-	-	1,25 ml
TrisHCl (1,5 M)	2,5 ml	2,5 ml	-
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,05 ml
agua destilada	3,567 ml	2,733 ml	2,825 ml
Persulfato amónico (1,5%)	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml	0,004 ml
volumen final	10 ml	10 ml	5 ml

Tabla M3. Composición de los geles de poli-acrilamida de concentración y de resolución.

El gel se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore), previamente empapada en metanol (Merck), con un aparato de electro-transferencia en semi-seco (BioRad). Para la transferencia se preparó un “sándwich” consistente en un papel “Extra Thick” (Bio-Rad), la membrana de PVDF, el gel y otro papel “Extra Thick”, todo previamente empapado en tampón de transferencia 1X (preparado diluyendo en agua destilada tampón 10X: Tris 30 g; glicina 144 g; SDS 10%; y añadiendo metanol 20%). Después de transferir durante 1 h a 12 V, la membrana se lavó con TBS/T (tampón Tris salino: Tris/HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM añadiendo Tween20 0,05%) durante 5 min y se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con TBS/T/leche en polvo desgrasada (5%, Central lechera asturiana). Después de tres lavados de 5 min cada uno con TBS/T, la membrana se incubó con diferentes anticuerpos primarios (tabla M4) diluidos en TBS/T/BSA (1%) durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C.

Después de 3 lavados, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (DAKO cytometry) diluido (1:2000) en TBS/T/leche (5%) durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se lavó la membrana otras 3 veces y se reveló el resultado con el kit Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer) mezclando volúmenes iguales de los dos reactivos (Enhanced luminol reagent y Oxidizing reagent), esta mezcla se aplicó sobre la membrana durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se secó el exceso de líquido con papel de filtro, se expuso a una película (Konica Minolta) en oscuridad y se procesó en una máquina de revelado Kodak X-OMAT.

	KDa	secundario	compañía	dilución
β-actina	40	ratón	abcam	1/2000
Bax	21	conejo	BD Pharmingen	1/500
Bcl-X_L	29	ratón	BD Pharmingen	1/500
Bcl2	26	conejo	Santa Cruz	1/500
Bim_{EL}/Bim_L	23/15	conejo	Calbiochem	1/500
Caspasa 3 (cortes)	17/19	conejo	Cell signaling	1/500
Caspasa 3 (pro-caspasa y cortes)	17/19/35	conejo	Cell signaling	1/500
Caspasa 9 (pro-caspasa y cortes)	37/39/49	conejo	Cell signaling	1/500
Caspasa 8 (pro-caspasa y cortes)	18/45/57	conejo	Cell signaling	1/500
Citocromo c	15	ratón	BD Pharmingen	1/1000
p-ATF2 (Thr71)	34*	Conejo	Cell signaling	1/500
p-ERK1/2	44/42	conejo	Cell signaling	1/500
p-JNK1/2	46/54	ratón	Cell signaling	1/500
p-p38	38	conejo	Cell signaling	1/500
p38α	38	conejo	Cell signaling	1/500
p38 (5F11)	38	ratón	Cell signaling	1/20

Tabla M4. Anticuerpos utilizados en el análisis por wb de la señalización celular. Se muestra el tamaño (KDa) de la proteína que reconocen, la especie en la que se han producido, así como la compañía y la dilución a la que se utilizan. * el peso molecular corresponde a la proteína de fusión utilizada en el ensayo de actividad (apartado 7).

Las mismas membranas se reutilizaron para la detección de distintas proteínas con anticuerpos producidos en las mismas o en otras especies. Para eliminar restos de anteriores anticuerpos, se utilizó la solución comercial Re-Blot Plus (Chemicon) durante 5-10 min a temperatura ambiente con agitación. Después se lavó la membrana y se volvió a bloquear.

Materiales y métodos

7. Inmunoprecipitación y ensayo de actividad quinasa

Se purificaron células T CD4⁺ como se explica en el apartado 3.1 y se dejaron en reposo en el incubador durante la noche en medio completo. Al día siguiente, se estimularon a una concentración de 3×10^6 células/ml durante 30 min con 1 $\mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 soluble (1 $\mu\text{g/ml}$ anti-IgG1) en combinación con anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$, usando 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-IgG, BD Pharmingen, como “crosslinker”). Posteriormente, se lisaron las células como se indica en el apartado 6.1. Para la inmunoprecipitación, se utilizó el lisado de más de 20×10^6 células (aproximadamente 200 μg de proteína) que se incubó durante 30 min junto con 30 μl de proteína-G-sefarosa (Invitrogen) en agitación orbital a 4°C para realizar un prelavado. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4°C y se descartó el sedimento. Al sobrenadante se añadieron 10 μl de anticuerpo anti-p38 (5F11, Cell signaling) y se incubó durante la noche, en agitación orbital a 4°C. Al día siguiente, se añadió a cada tubo 30 μl de proteína-G-sefarosa y se mantuvieron en agitación orbital durante 90 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 14.000 rpm, 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se añadieron 200 μl de tampón de lisis. Esta operación de lavado se repitió 3 veces. Seguidamente, se realizaron otros 3 lavados con tampón quinasa (Cell signaling; 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM β -glicerofosfato, 2 mM ditioneitol (DTT), 0,1 mM Na_3VO_4 , 10 mM MgCl_2). Después del último lavado se descartó el sobrenadante, se añadieron 50 μl de tampón quinasa, 1 μg de proteína de fusión ATF2 (Cell signaling) y ATP (Cell signaling) 50 μM . La mezcla se mantuvo durante 20 min a 30°C, después se añadió tampón de carga 4X y se hirvieron las muestras a 100°C durante 10 min.

Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 10% y se analizaron mediante wb (ver apartado 6.2) incubando las membranas con los anticuerpos primarios frente a p38 α y p-ATF2.

8. Análisis estadístico

Se realizó la prueba t de Student de dos colas para calcular la significación estadística de los datos, que se consideró a partir de $p < 0,05$, siendo * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ y *** para $p < 0,001$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Los ratones deficientes en *Gadd45b* desarrollan una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematoso sistémico

Los ratones *Gadd45b*^{-/-} no presentan problemas durante el desarrollo embrionario y se reproducen con normalidad dentro de la relación mendeliana. Se desarrollan sin síntomas clínicos de enfermedad durante los primeros 5 meses de vida. A partir de esa edad la mortalidad espontánea empieza a ser más alta que en los ratones wt (Fig. R1A). La mediana de supervivencia (edad a la cual el 50 % de los ratones han muerto) es menor tanto en los machos (M) *Gadd45b*^{-/-} (*Gadd45b*^{-/-}=18 vs. wt=25 meses) como en las hembras (H) *Gadd45b*^{-/-} (*Gadd45b*^{-/-}=17 vs. wt=26 meses), respecto a la mediana de los ratones wt (Fig. R1B).

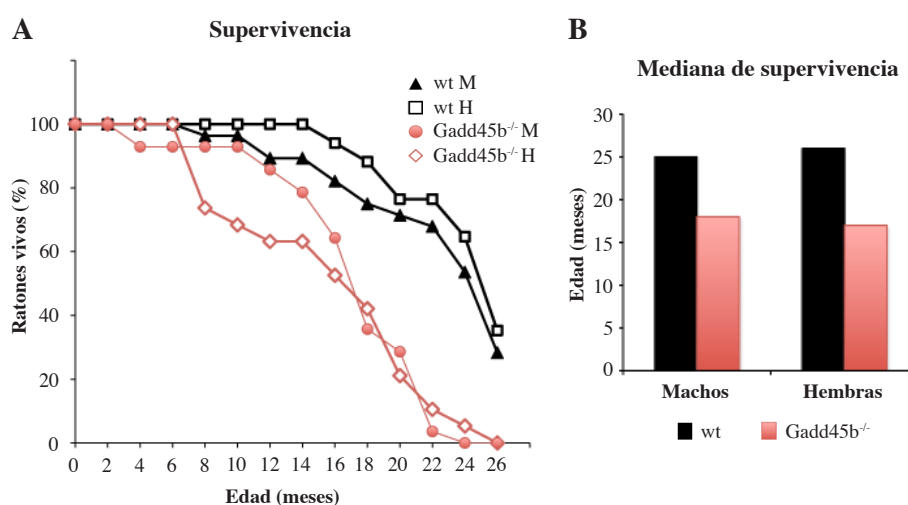


Figura R1. Los ratones *Gadd45b*^{-/-} tienen una muerte prematura. (A) Representación de la curva de supervivencia y (B) la mediana de los ratones wt y *Gadd45b*^{-/-}. Animales de este estudio: wt M=29, wt H=17; *Gadd45b*^{-/-} M=19, *Gadd45b*^{-/-} H=27.

Para detectar la causa de esta elevada mortalidad espontánea se realizó una caracterización patológica de los ratones mayores de 12 meses. Los ratones *Gadd45b*^{-/-} tanto machos como hembras, presentan hiperplasia de timo, nódulos linfoides y bazo; así como nefropatía crónica. Las hembras *Gadd45b*^{-/-} tienen una concentración elevada de proteínas en orina (162±66 mg/dl) comparado con las hembras wt (67±18 mg/dl)(Tabla R1).

	Proteinuria	
	wt	<i>Gadd45b</i> ^{-/-}
Positivos	4 (n=21) 19%	15 (n=41) 36,6%
Concentración (mg/dl)	67±18	162±66

Tabla R1. Niveles de proteinuria en ratones wt y *Gadd45b*^{-/-}. Número de animales utilizados en este estudio (n), porcentaje de hembras con proteinuria y concentración de proteínas en orina (mg/dl; media±s.e.m.).

La proteinuria es característica de una deficiente función renal (Cameron, 1999), por lo que se examinaron cortes histológicos de la corteza renal. Por inmunofluorescencia se observa

Resultados

un incremento de depósitos de IgG en los glomérulos renales de ratones *Gadd45b*^{-/-} comparado con los ratones wt (Fig. R2A). El análisis histopatológico llevado a cabo por la Dra. Juana Flores (Universidad Complutense de Madrid) reveló que los ratones deficientes presentan espontáneamente glomerulonefritis membranoproliferativa (Fig. R2B), caracterizada por un aumento del número de células en los glomérulos con una mayor proliferación de células endoteliales y mesangiales, así como un engrosamiento de la membrana basal de los capilares (causado por los depósitos de inmuno-complejos).

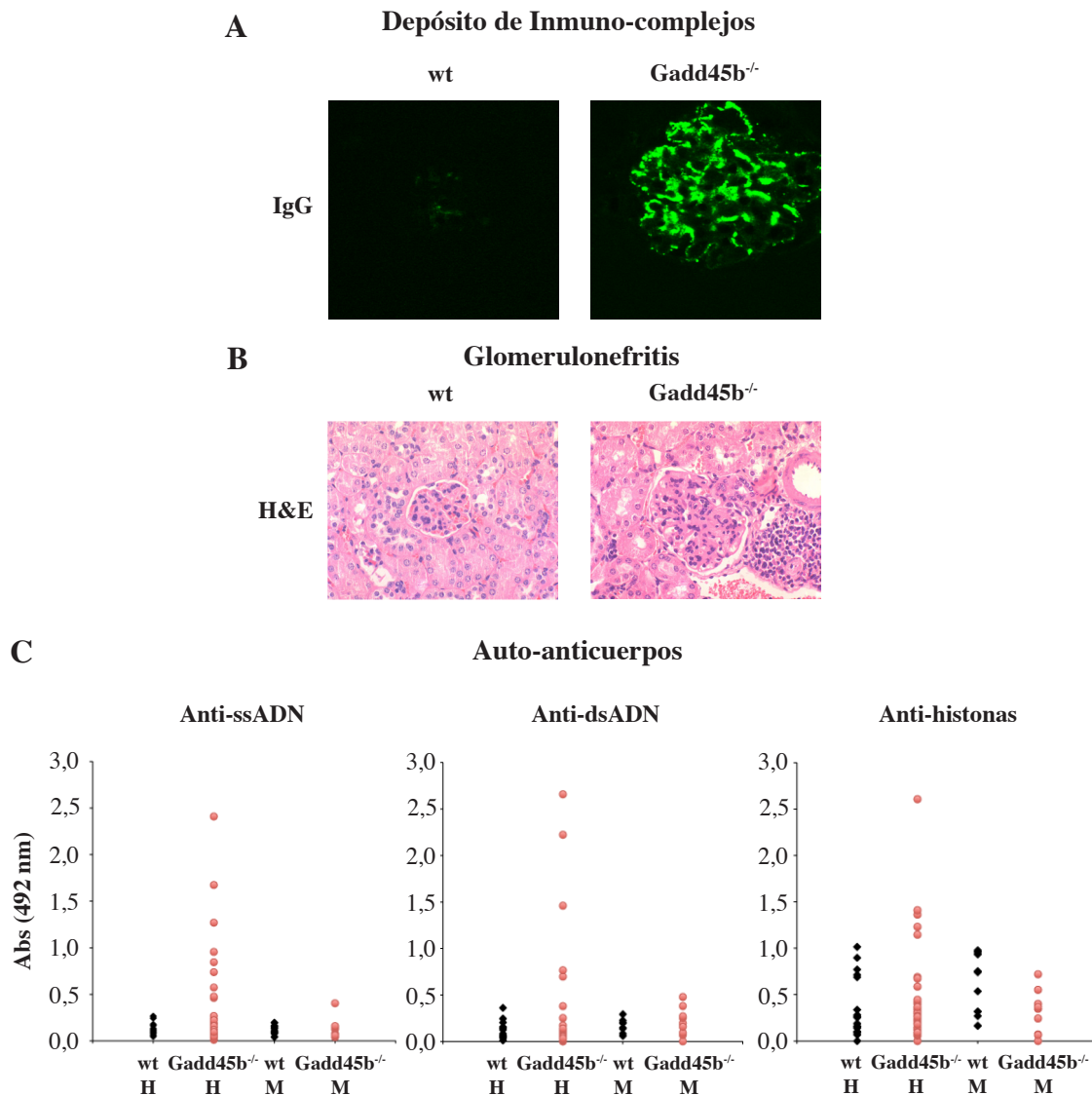


Figura R2. Caracterización de la enfermedad autoinmune en ratones *Gadd45b*^{-/-}. Análisis histológico de los glomérulos de ratones wt (izquierda) y *Gadd45b*^{-/-} (derecha) mostrando (A) inmunofluorescencia que evidencia el depósito de IgG en glomérulos de ratones deficientes en *Gadd45b* y (B) tinción con hematoxilina/eosina que muestra la presencia de glomerulonefritis en el riñón de ratones *Gadd45b*^{-/-}. Imágenes representativas de al menos 4 ratones. (C) Presencia de auto-anticuerpos frente a ssADN, dsADN e histonas en suero de hembras deficientes en *Gadd45b*, se representan los datos correspondientes a la dilución 1:250. Número de animales utilizados en este estudio: wt H=19, wt M=10; *Gadd45b*^{-/-} H=43, *Gadd45b*^{-/-} M=11.

Otro síntoma clínico característico de patologías autoinmunes consiste en el desarrollo espontáneo de auto-anticuerpos. Se analizó la presencia de anticuerpos específicos frente a ADN

de cadena simple (ssADN), ADN de cadena doble (dsADN) e histonas en suero de los ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Los machos no muestran diferencias en la presencia de auto-anticuerpos (medida por la absorbancia, Abs, a 492 nm), sin embargo las hembras deficientes en Gadd45b presentan mayor cantidad de anticuerpos frente a ssADN y dsADN que las hembras wt, aunque la cantidad de anticuerpos frente a histonas es similar (Fig. R2C).

Nuestros datos indican que la ausencia de Gadd45b en ratones conduce al desarrollo de una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematoso sistémico caracterizado por la presencia de auto-anticuerpos anti-nucleares, proteinuria, acumulación de inmunoglobulinas en el riñón y desarrollo de glomerulonefritis que ocasionan la muerte prematura de los ratones.

2. Gadd45b controla la homeostasis de la tolerancia periférica

2.1. Los ratones Gadd45b^{-/-} muestran un fenotipo inmunológico alterado en los órganos linfoides secundarios.

Para estudiar en detalle el desarrollo espontáneo de autoinmunidad en estos ratones, se realizó un estudio pormenorizado del fenotipo inmunológico. Se analizaron ratones wt y Gadd45b^{-/-} de distintas edades para ver la evolución de las diferentes poblaciones de linfocitos T y B en los órganos linfoides. Se dividieron en tres grupos: ratones jóvenes (1-2 meses), que todavía no presentan signos de enfermedad, de mediana edad (7-8 meses), donde empieza a descender la supervivencia de los ratones Gadd45b^{-/-}, y ratones mayores (>12 meses), edad en la que presentan signos de autoinmunidad (Fig. R1).

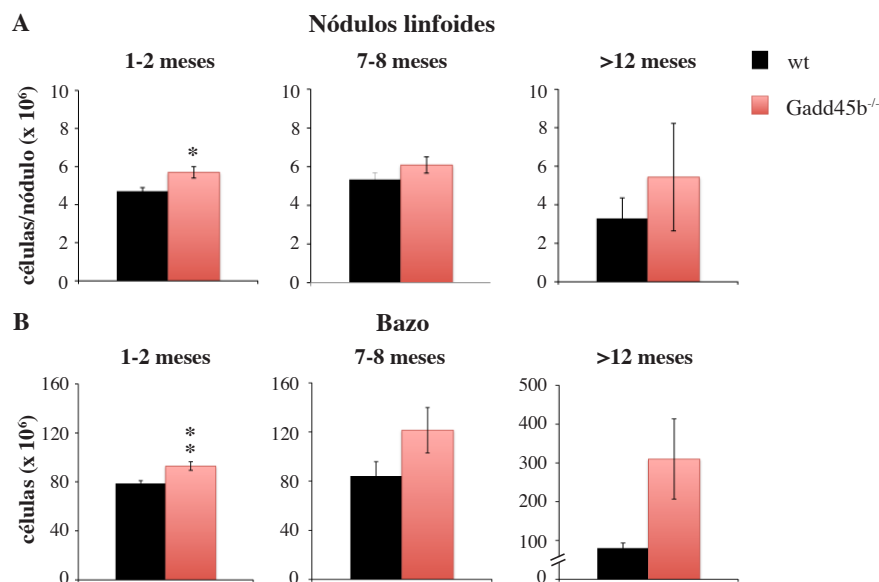


Figura R3. Los ratones deficientes en Gadd45b presentan un mayor número de células en nódulos linfoides y bazo comparado con los ratones wt. Número de células en nódulos linfoides (A) y bazo (B) de ratones wt y Gadd45b^{-/-} agrupados por edades. Se observa un incremento en el número de células en ambos órganos en ratones deficientes en Gadd45b, siendo significativa para los ratones de 1-2 meses (* $p < 0,05$ para nódulos linfoides y ** $p < 0,01$ para bazo). En este y todos los análisis siguientes del fenotipo inmunológico se utilizaron los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo (1-2meses wt=6, Gadd45b^{-/-}=6; 7-8 meses wt=4, Gadd45b^{-/-}=4; >12 meses wt=4, Gadd45b^{-/-}=4) y, en todos ellos, se representa la media \pm s.e.m.

Resultados

El conteo celular confirmó lo ya observado en el análisis patológico; en todas las edades los ratones deficientes en *Gadd45b* muestran hiperplasia en nódulos linfoides y bazo (Fig. R3A y B), siendo significativa en los ratones más jóvenes ($Gadd45b^{-/-}=5,4\pm 0,3$ vs. $wt=4,7\pm 0,2$ millones de células en nódulos linfoides, $p=0,0103$; y $Gadd45b^{-/-}=92,9\pm 3,5$ vs. $wt=78,6\pm 2,4$ millones de células en bazo, $p=0,0011$).

Cuando se analizaron por citometría de flujo las distintas poblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y linfocitos B (representado por B220), se observó que la hiperplasia en los órganos linfoides secundarios es debida al incremento de células T pero no de células B (Fig. R4). Dentro de la población de células T, se observa un aumento del porcentaje de células CD4⁺ tanto en los nódulos linfoides como en el bazo de los ratones *Gadd45b*^{-/-} frente a los ratones wt. Este incremento es significativo en el bazo del grupo de los ratones de 7-8 meses ($Gadd45b^{-/-}=26,7\pm 1,0$ vs. $wt=20,3\pm 0,6\%$; $p=0,0112$) y de los ratones >12 meses ($Gadd45b^{-/-}=28,3\pm 1,4$ vs. $wt=15,1\pm 0,9\%$; $p=0,5\times 10^{-4}$).

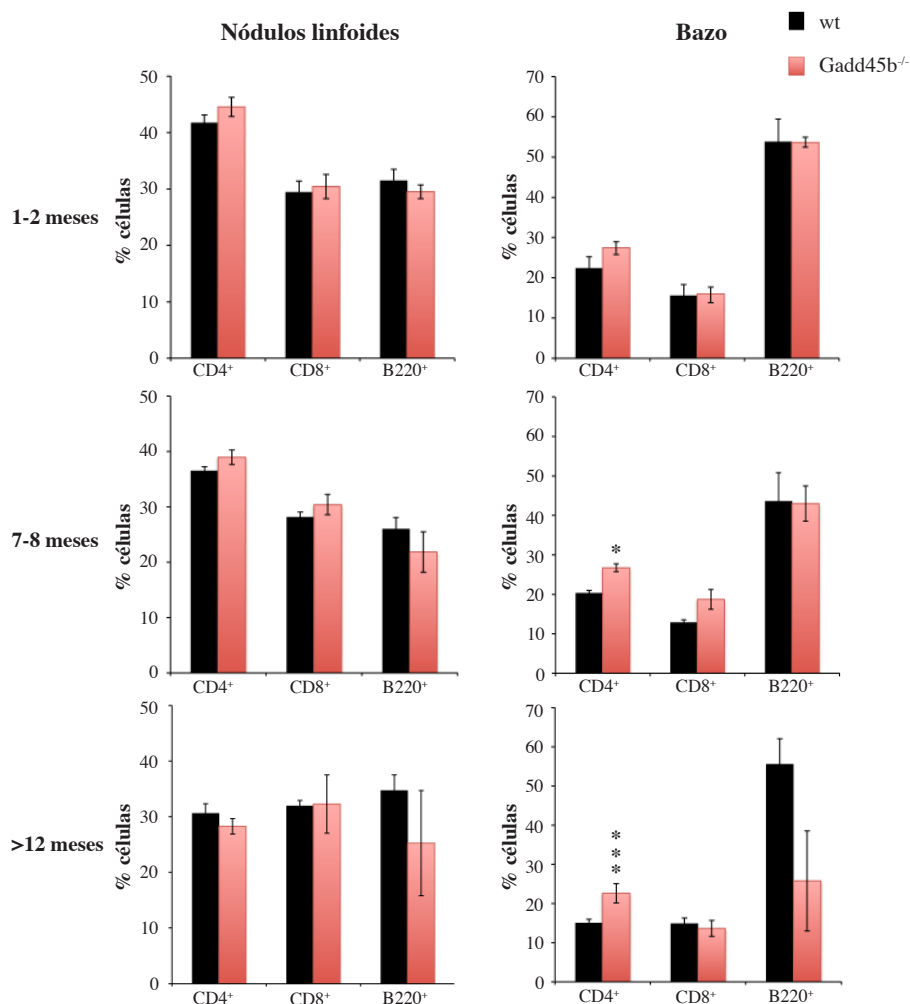


Figura R4. Porcentaje de células T (CD4⁺ y CD8⁺) y células B (B220⁺) presentes en nódulos linfoides y bazo de ratones wt y *Gadd45b*^{-/-}. Se observan diferencias en la población de células T CD4⁺ de los ratones *Gadd45b*^{-/-} frente a los ratones wt. Estas diferencias son significativas en el bazo de los ratones deficientes de 7-8 meses (* $p<0,05$) y >12 meses (***) $p<0,001$). Se representa la media \pm s.e.m. de los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo.

Posteriormente, se estudió la expresión de marcadores específicos de activación, de memoria y de linfocitos T reguladores en nódulos linfoides y bazo. Estas poblaciones sufren cambios con la edad y suelen estar alteradas en procesos autoinmunes. Mediante citometría de flujo se analizaron las poblaciones de células activadas (CD25⁺), células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) y células de memoria (CD44⁺ y CD62L⁺).

Respecto a la población de células CD25⁺, se observa un incremento significativo en el bazo de los ratones Gadd45b^{-/-} de 1-2 meses con respecto a los ratones wt (Gadd45b^{-/-}=16,4±1,6 vs. wt=11,0±1,4%; *p*=0,0213) (Fig. R5). Esta diferencia se acentúa con la edad, haciéndose significativa en los ratones mayores de 12 meses, tanto en nódulos linfoides (Gadd45b^{-/-}=23,4±2,4 vs. wt=13,5±1,0%; *p*=0,0006) como en bazo (Gadd45b^{-/-}=24,9±3,2 vs. wt=14,3±2,0%; *p*=0,0099).

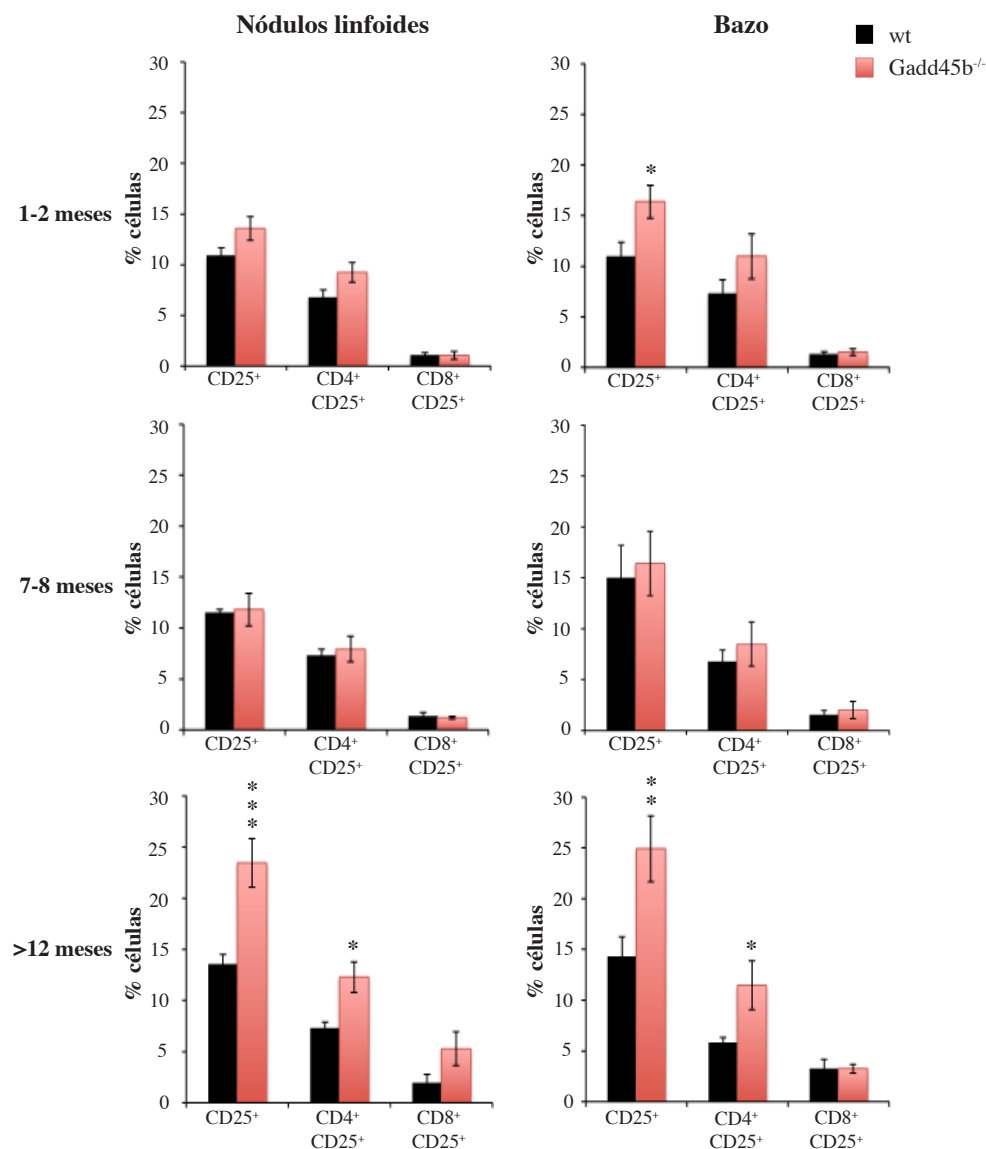


Figura R5. Porcentaje de células T (CD4⁺ y CD8⁺) que expresan CD25 en nódulos linfoides y bazo de ratones wt y Gadd45b^{-/-} agrupados por edades. Se observa un incremento de células CD25⁺ en ambos órganos de ratones deficientes en Gadd45b, especialmente representadas por la población de CD4⁺. Esta diferencia va aumentando con la edad hasta hacerse estadísticamente significativa en los ratones mayores 12 meses. Se representa la media±s.e.m. de los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo (**p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001).

Resultados

Este aumento en la población de linfocitos activados viene representado, principalmente, por las células CD4⁺CD25⁺ (Fig. R5) que aparecen aumentadas con respecto al ratón wt en nódulos linfoides y bazo en todas las edades, pero de manera significativa en los ratones mayores de 12 meses (nódulos linfoides Gadd45b^{-/-}=12,3±1,5 vs. wt=7,3±0,6%; *p*=0,0111; bazo Gadd45b^{-/-}=11,5±2,4 vs. wt=5,8±0,5%; *p*=0,0331).

Resumiendo, los ratones deficientes en Gadd45b tienen un aumento en la población de linfocitos T CD4⁺ activados en nódulos linfoides y bazo respecto a los ratones wt. Posteriormente, se analizó la población de células T reguladoras (T_{regs}) en base a la expresión de los marcadores CD4 y CD25 y Foxp3, éste último específico de células T_{regs}. Como se indica en la tabla R2, no se observan diferencias significativas en la población de T_{regs} entre los ratones wt y Gadd45b^{-/-} en ninguno de los órganos estudiados. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que las células T CD4⁺ de ratones deficientes en Gadd45b presentan una mayor activación comparado con las células del ratón wt. El elevado número de células T CD4⁺ hiper-activadas es característico de ciertas enfermedades autoinmunes.

		CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ (%)			
		Nódulos linfoides		Bazo	
1-2 meses	wt	6,2±1,5	<i>p</i> =0,54	3,5±0,9	<i>p</i> =0,38
	Gadd45b ^{-/-}	5,3±0,4		4,5±0,6	
7-8 meses	wt	4,8±0,2	<i>p</i> =0,29	3,3±0,2	<i>p</i> =0,31
	Gadd45b ^{-/-}	5,5±0,6		3,8±0,4	
>12 meses	wt	2,8±1,1	<i>p</i> =0,43	1,7±0,6	<i>p</i> =0,31
	Gadd45b ^{-/-}	4,7±2,0		3,9±1,8	

Tabla R2. Porcentaje (%) de células T_{regs} (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) en ratones wt y Gadd45b^{-/-}. No se observan diferencias significativas. Se representa la media±s.e.m. de los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo.

A continuación, se analizaron las poblaciones de memoria en nódulos linfoides y bazo mediante el estudio de los marcadores CD44 y CD62L (Fig. R6). Se observa un aumento significativo en la población de células CD44⁺ en los nódulos linfoides de los ratones Gadd45b^{-/-} de 1-2 meses (Gadd45b^{-/-}=69,3±1,6 vs. wt=58,9±1,5%; *p*=0,5x10⁻⁴), de 7-8 meses (Gadd45b^{-/-}=80,4±1,7 vs. wt=71,9±0,9%; *p*=0,0003) y >12 meses (Gadd45b^{-/-}=87,1±1,9 vs. wt=77,4±1,5%; *p*=0,0008) respecto a los ratones wt. Este aumento sólo se observa en el bazo de los ratones >12 meses (Gadd45b^{-/-}=93,7±0,9 vs. wt=88,4±0,9%; *p*=0,0006). También observamos una disminución significativa de la población CD62L⁺, tanto en los nódulos linfoides como en el bazo de los ratones Gadd45b^{-/-} >12 meses con respecto a los wt (nódulos linfoides Gadd45b^{-/-}=53,1±5,2 vs. wt=84,6±1,0%; *p*=0,1x10⁻⁴; bazo Gadd45b^{-/-}=38,3±6,6 vs. wt=79,4±3,2%; *p*=0,8x10⁻⁵).

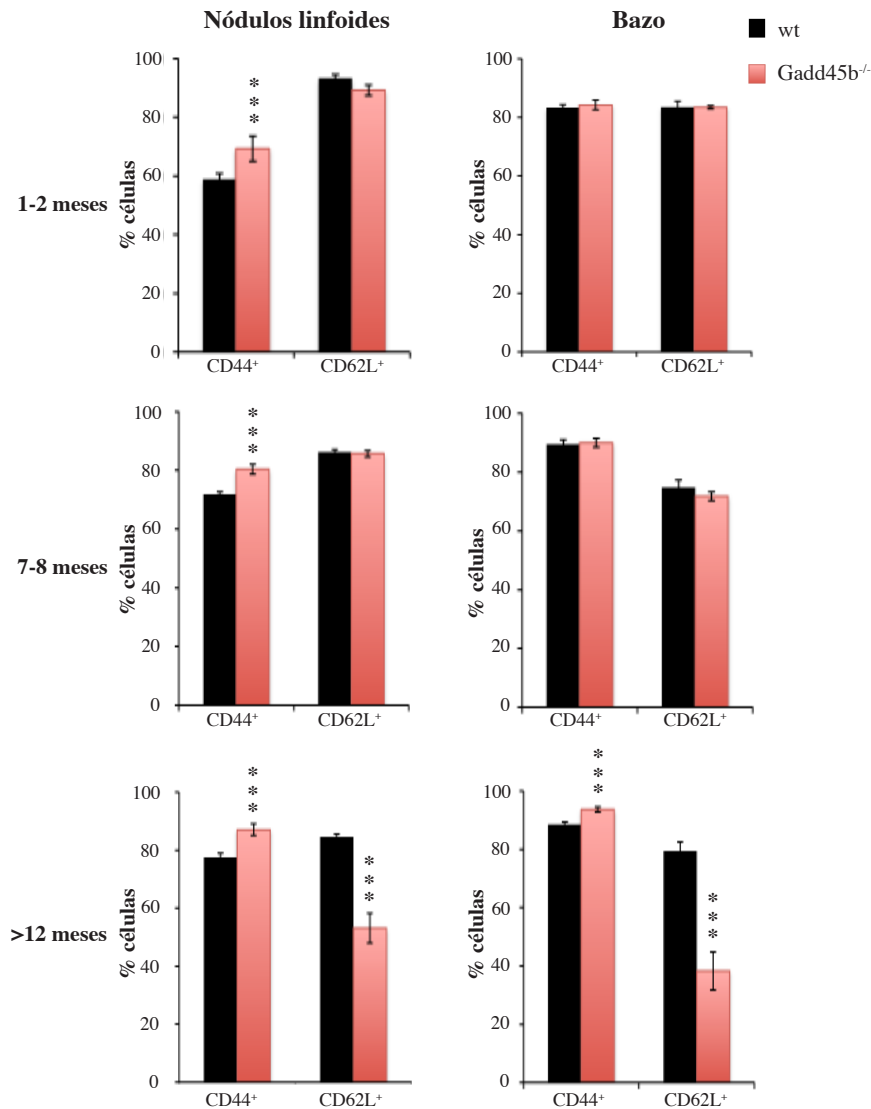


Figura R6. Porcentaje de células que expresan marcadores de memoria CD44 y CD62L. Los ratones Gadd45b^{-/-} presentan una acumulación significativa de células CD44⁺ en nódulos linfoides, en todas las edades y en el bazo, en los ratones más mayores respecto a los ratones wt. Además, se observa una disminución significativa de la población CD62L⁺, tanto en nódulos linfoides como en bazo de los ratones deficientes en Gadd45b >12 meses. Se representa la media±s.e.m. de los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo (***) $p < 0,001$.

Al estudiar en detalle las poblaciones de memoria de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se observa que la acumulación de células CD44⁺ en nódulos linfoides de ratones Gadd45b^{-/-} se corresponde con el aumento de la población CD4⁺CD44⁺ (Fig. R7). Esta acumulación aparece tanto en los nódulos linfoides como en el bazo de los ratones Gadd45b^{-/-} más jóvenes de 1-2 meses (nódulos linfoides Gadd45b^{-/-}=36,9±4,4 vs. wt=21,9±1,9%; $p=0,02$; bazo Gadd45b^{-/-}=21,9±2,3 vs. wt=14,6±1,3%; $p=0,05$) y en los de mediana edad de 7-8 meses (nódulos linfoides Gadd45b^{-/-}=37,3±1,3 vs. wt=26,6±1,0%; $p=0,0006$; bazo Gadd45b^{-/-}=28,5±1,2 vs. wt=19,6±0,7%; $p=0,0010$). También se observa la disminución en la población de células CD62L⁺ en los ratones Gadd45b^{-/-} >12 meses. En este caso, disminuyen las dos poblaciones de linfocitos T, CD4⁺ y CD8⁺, tanto en los nódulos linfoides como en el bazo, aunque debido a la variabilidad solo se encuentra significación en la

Resultados

disminución de células $CD4^+CD62L^+$ en nódulos linfoides ($Gadd45b^{-/-}=10,7\pm 2,4$ vs. $wt=26,8\pm 2,4\%$; $p=0,003$) y en las $CD8^+CD62L^+$ en bazo ($Gadd45b^{-/-}=4,8\pm 1,8$ vs. $wt=14,6\pm 2,3\%$; $p=0,014$).

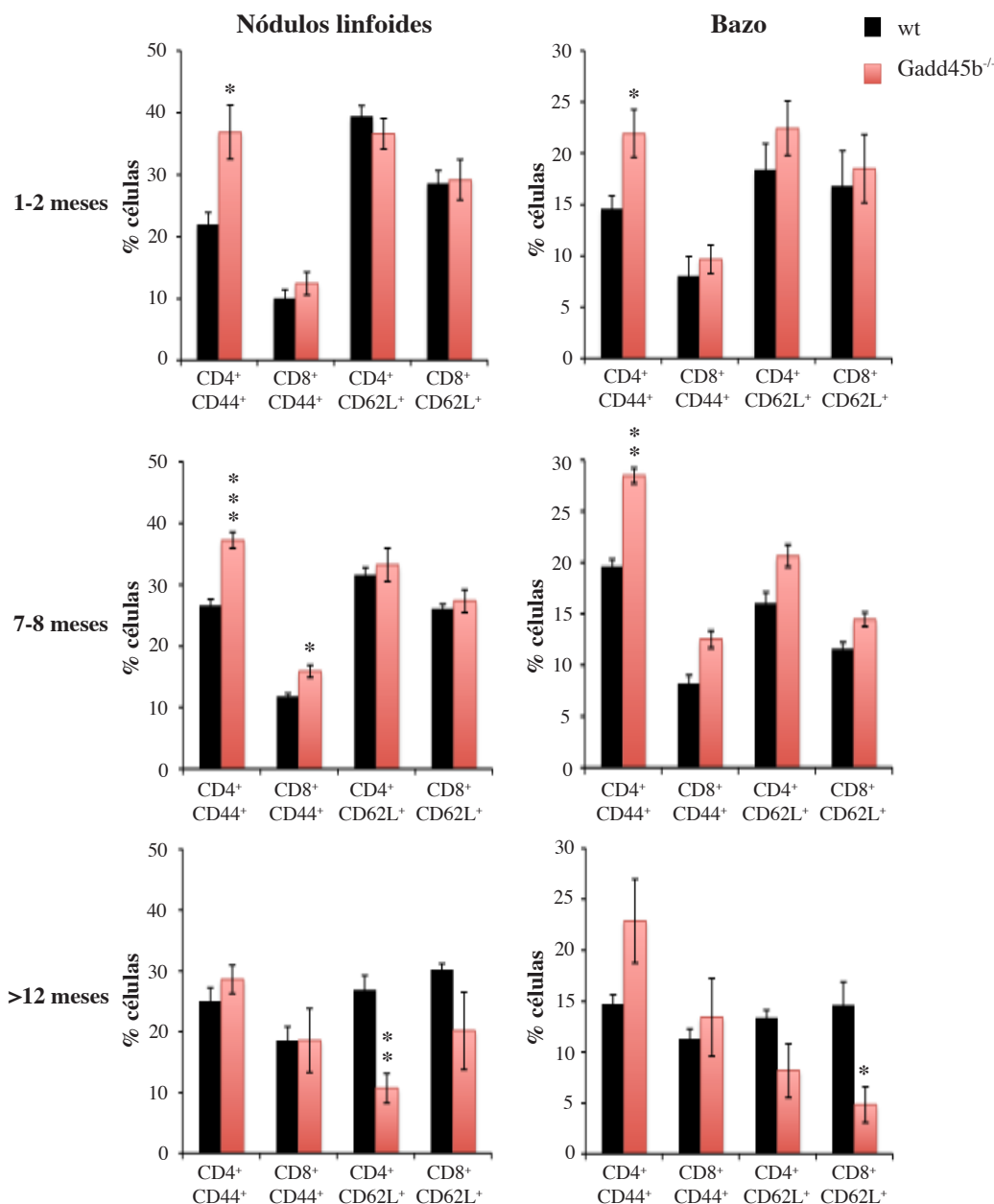


Figura R7. Porcentaje de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ que expresan marcadores de memoria $CD44$ y $CD62L$ procedentes de nódulos linfoides y bazo de ratones wt y $Gadd45b^{-/-}$. Se observa una acumulación de células T $CD44^+$ en los ratones $Gadd45b^{-/-}$ apareciendo en todas las edades, de forma más significativa en el caso de las células T $CD4^+$. La disminución en la población $CD62L^+$ se observa tanto en la población de células T $CD4^+$ como en la de células T $CD8^+$ siendo significativa en los ratones más mayores en bazo. Se representa la media \pm s.e.m. de los nódulos linfoides y bazo de al menos 4 ratones por genotipo (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

En resumen, el estudio del fenotipo inmunológico de los ratones wt y $Gadd45b^{-/-}$ indica un incremento del número de células en nódulos linfoides y en bazo de los ratones $Gadd45b^{-/-}$ con respecto a los órganos procedentes de los ratones wt. Este incremento se debe, sobre todo, a la población de células T $CD4^+$, y dentro de ésta se encuentran aumentadas las células activadas

(CD25⁺) y de memoria (CD44⁺) (Fig. R8). Además existe una disminución en la población de células T CD62L⁺ en los órganos linfoides secundarios de los ratones deficientes en Gadd45b.

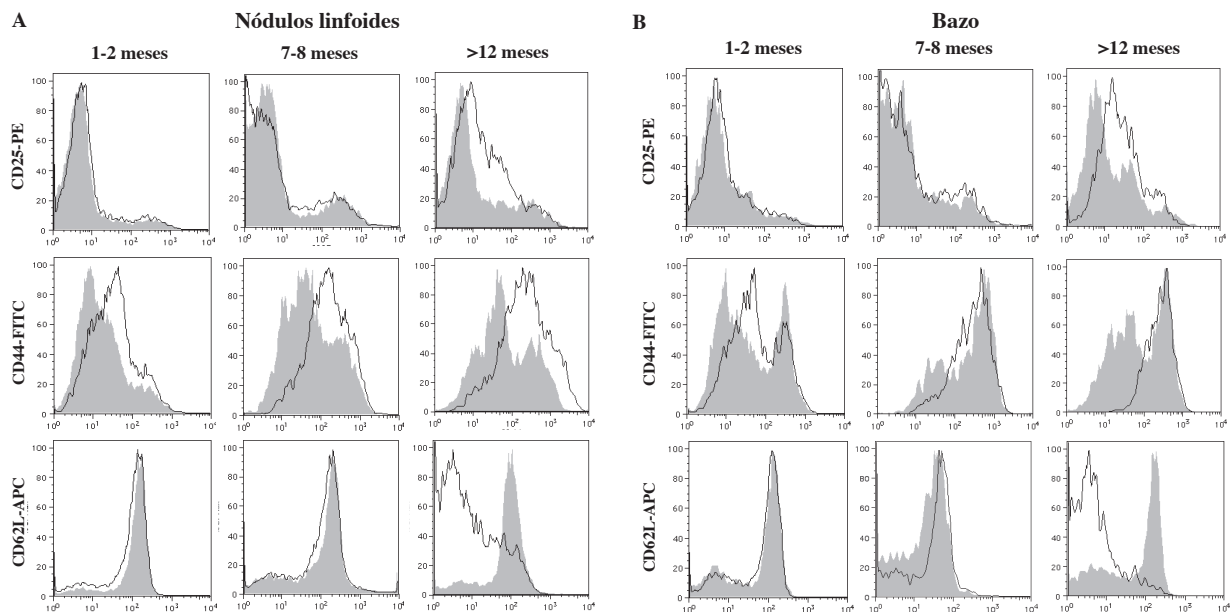


Figura R8. Las células T CD4⁺ de los ratones Gadd45b^{-/-} presentan mayor expresión de CD25 y CD44 y menor de CD62L respecto a las células wt, acentuándose esta diferencia con la edad. Perfiles de expresión de CD25, CD44 y CD62L en las células T CD4⁺ de nódulos linfoides (A) y bazo (B) a diferentes edades. En ambos órganos, se observa el incremento de la población positiva para CD25 y CD44 en las células deficientes en Gadd45b (línea negra) conforme aumenta la edad de los ratones, con respecto a las células wt (gris). Inicialmente, en los ratones más jóvenes, la expresión de CD25 es igual en ambos genotipos y la expresión de CD44 mayor en las células Gadd45b^{-/-}. La expresión de CD62L disminuye a medida que aumenta la edad en los ratones deficientes en Gadd45b comparado con las células de los wt. Se muestra un histograma representativo.

El fenotipo autoinmune de las células T CD4⁺, de memoria y activación, encontrado en los ratones deficientes en Gadd45b es consistente con un envejecimiento prematuro en el sistema inmunológico de estos ratones. Mientras que los ratones wt mayores de 12 meses no muestran cambios importantes con respecto a los jóvenes, los ratones deficientes de la misma edad muestran alguno de los cambios característicos del envejecimiento del sistema inmunológico. Las distintas poblaciones estudiadas sufren cambios con la edad en un proceso llamado inmuno-senescencia. La acumulación de células CD44⁺ y la disminución de las CD62L⁺ son típicas de este proceso (Barrat y col., 1995; Ginaldi y col., 2004). También se observa una disminución (no significativa) en la población de linfocitos B en los ratones Gadd45b^{-/-} mayores de 12 meses, tanto en nódulos linfoides como en bazo, lo que también ocurre en procesos de inmuno-senescencia (Linton y Dorshkind, 2004). Este aspecto debe ser estudiado en mayor profundidad con el fin de aclarar si este fenotipo es debido a un proceso de inmuno-senescencia o, bien, a la propia enfermedad y la alteración de la función de las células T CD4⁺, descrita en apartados posteriores.

Resultados

2.2. Estudio del papel de Gadd45b y p38 en la función de las células T CD4⁺

2.2.1. Gadd45b es un regulador negativo de proliferación de las células T CD4⁺ en respuesta a la estimulación del TCR

Se analizó si el mayor número de células T CD4⁺ preactivadas en ratones Gadd45b^{-/-} era consecuencia de una ventaja proliferativa. Para evaluar el papel de Gadd45b en la respuesta proliferativa, se activaron células de nódulos linfoides y células T CD4⁺ purificadas (de nódulos linfoides y bazo) con concentraciones crecientes de distintos estímulos mitogénicos; anti-CD3 (α CD3), Concanavalina A (ConA) e IL2, y se determinó la curva de proliferación mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada. Los resultados muestran un comportamiento hiperproliferativo de las células de ratones Gadd45b^{-/-}, sobre todo de las células T CD4⁺ purificadas (Fig. R9), en respuesta a anti-CD3 y ConA comparadas con las del wt. También se observa una mayor proliferación en respuesta a IL2 en células T CD4⁺ purificadas, aunque la diferencia en las curvas dosis-respuesta es menor en este caso. Las células T CD4⁺ de ratones deficientes en Gadd45b proliferan más en respuesta a una estimulación del TCR que las células wt, lo que sugiere que Gadd45b es un regulador negativo de proliferación en estas células.

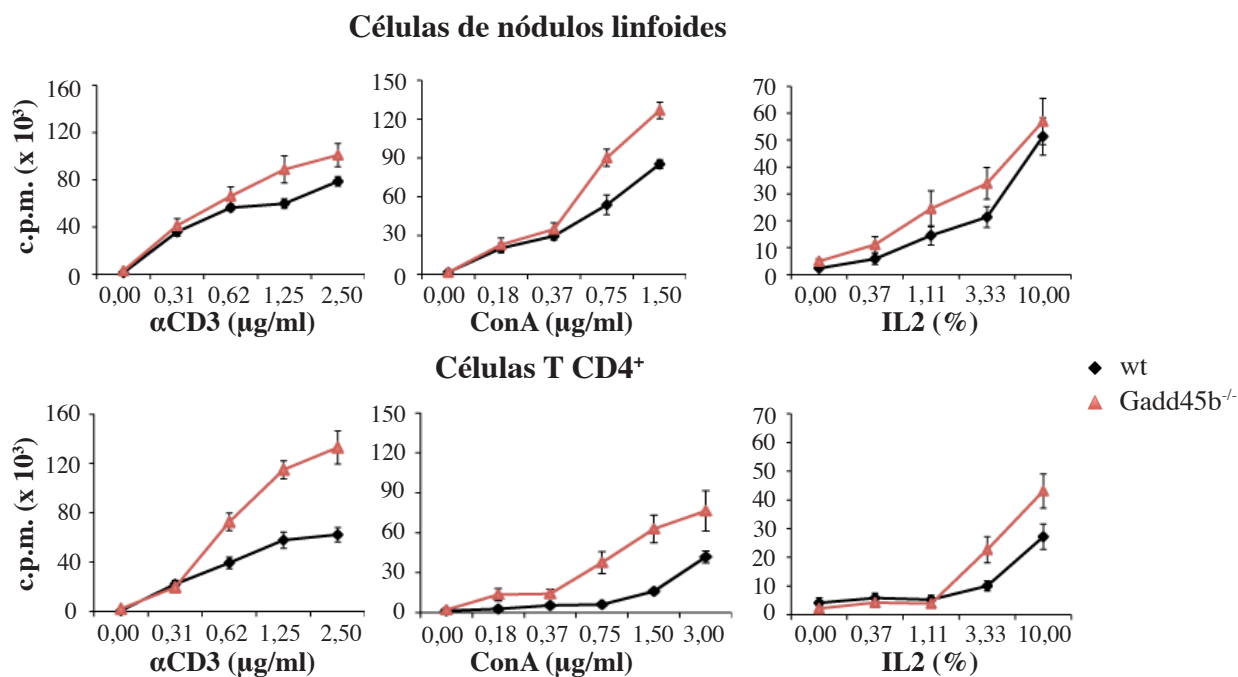


Figura R9. Las células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b presentan hiperproliferación en respuesta a diferentes estímulos mitogénicos. Curva de proliferación de células de nódulos linfoides y T CD4⁺ purificadas en respuesta a dosis crecientes de anti-CD3 (α CD3), ConA e IL2. Las células se estimularon con los distintos mitógenos durante 48 h y se analizó la incorporación de timidina tritiada durante las siguientes 16 h del ensayo. Se observa una mayor respuesta proliferativa (representada por cuentas por minuto, c.p.m.) en las células deficientes en Gadd45b en todas las condiciones pero especialmente cuando son estimuladas con anti-CD3. Se representa la media \pm s.e.m. de los triplicados de al menos 4 ratones por genotipo.

2.2.2. Gadd45b regula la muerte inducida por activación en células T CD4⁺

Uno de los procesos más importantes implicados en el mantenimiento de la tolerancia periférica es la AICD (Marsden y Strasser, 2003). Para determinar si la falta de Gadd45b afecta a este proceso, células T CD4⁺ purificadas de nódulos linfoides y bazo de ratones wt y Gadd45b^{-/-} se dejaron sin estímulo en medio completo o se trataron con ConA durante 24 h. Para simular de una forma más específica la AICD, se trataron las células con una combinación de estimulación primaria con anti-CD3 durante 2 días y, posteriormente, una estimulación secundaria con una dosis mayor de anti-CD3 o ConA para inducir la muerte celular. Después de 24 h, se recogieron las células y se analizó el porcentaje de células muertas por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio.

El análisis de la distribución del ciclo celular (Fig. R10) muestra una disminución significativa del porcentaje de células T CD4⁺ Gadd45b^{-/-} que se encuentran en fase subG1 (células muertas) comparado con las células de wt tanto sin estimulación (Gadd45b^{-/-}=18,6±2,6 vs. wt=30,5±2,3%, $p=0,024$) como después de la estimulación con ConA (Gadd45b^{-/-}=22,9±3,7 vs. wt=40,4±5,2%, $p=0,036$) o la combinación de anti-CD3/anti-CD3 (Gadd45b^{-/-}=25,2±2,8 vs. wt=34,6±0,6%, $p=0,039$) y anti-CD3/ConA (Gadd45b^{-/-}=30,6±2,4 vs. wt=46,9±2,7%, $p=0,011$). Estos resultados sugieren un papel de Gadd45b como regulador positivo de apoptosis en células T CD4⁺.

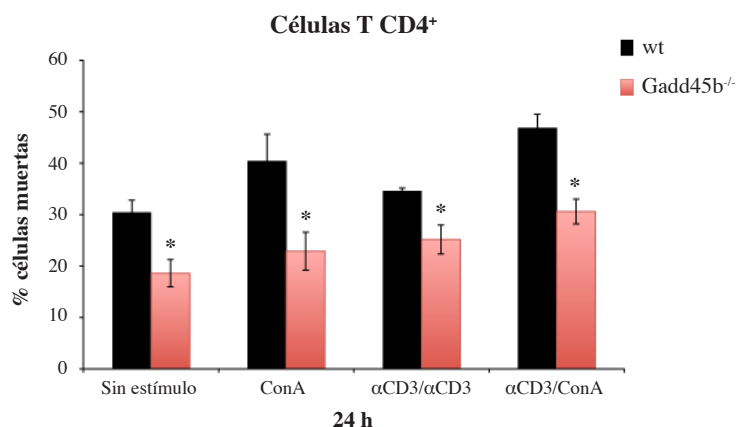


Figura R10. Las células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b muestran un defecto en AICD. Porcentaje de células T CD4⁺ muertas (en fase SubG1) de ratones wt y Gadd45b^{-/-} sin estímulo durante 24 h y con diferentes tratamientos inductores de la muerte por activación: ConA (10 µg/ml) durante 24 h o una estimulación primaria con anti-CD3 (5 µg/ml) durante dos días y una secundaria también con anti-CD3 (10 µg/ml) (αCD3/αCD3) o con ConA (10 µg/ml) (αCD3/ConA) durante otras 24 h. Se observa una disminución significativa en el porcentaje de muerte celular en las células de ratones deficientes en Gadd45b con respecto a las wt en todas las condiciones ensayadas. Se representa la media±s.e.m. (* $p<0,05$) de 4 ratones en todas las condiciones.

Varios estudios han propuesto que Gadd45b puede inducir apoptosis mediante la activación de la ruta de las MAPKs a través de la interacción y activación de la quinasa MEKK4. Gadd45b se une a la MEKK4 liberando un dominio auto-inhibitorio lo que permite su activación y posterior fosforilación de sus sustratos: las quinasas MKK3, MKK6 y MKK4 que, finalmente, activarán a p38 y JNK (Chi y col., 2004; Takekawa y col., 2011; Takekawa y Saito, 1998). Se analizó la activación

Resultados

de las MAPKs p38, JNK y ERK en células T CD4⁺ purificadas activándolas con anti-CD3 solo o en combinación con anti-CD28 (co-estimulación). Las células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b presentan una menor fosforilación de p38 que se correlaciona con una menor actividad (Fig. R11A y B); también se observa menor activación de JNK, mientras que no se aprecian diferencias en la fosforilación de ERK con respecto a los ratones wt. Esta observación es consistente con los datos publicados por Liu y colaboradores (Liu y col., 2005) que sugieren que Gadd45b regula la función de las células T CD4⁺ a través de la activación de MEKK4.

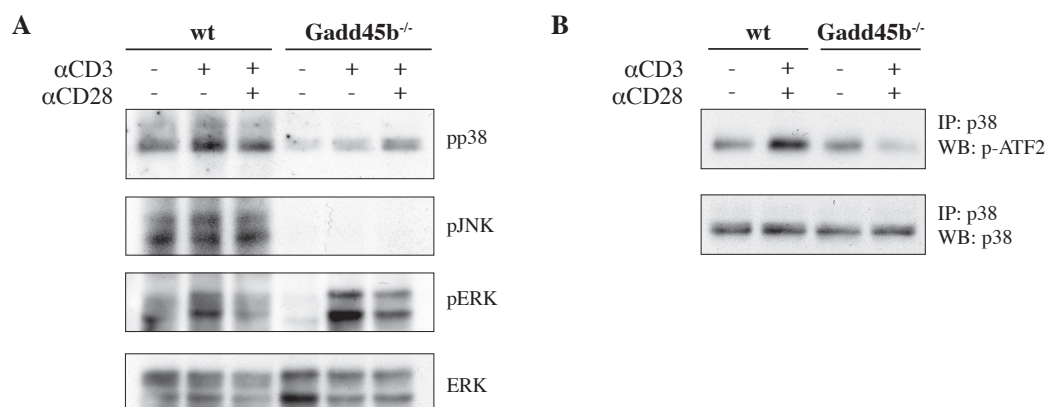


Figura R11. Las células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b presentan un fallo en la activación de p38. (A) Análisis de la activación de MAPKs en las células T CD4⁺ de ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Las células se mantuvieron sin activación o se incubaron con anti-CD3 (2 µg/ml) o anti-CD3 (2 µg/ml) + anti-CD28 (2 µg/ml) durante 15 minutos. Se observa una menor activación de p38 y JNK (determinada por la fosforilación) en las células deficientes en Gadd45b respecto a las células T CD4⁺ del ratón wt. No se encuentran diferencias en la activación de ERK. ERK como control de carga. Wb representativo de 3 experimentos. (B) Inmunoprecipitación y ensayo de actividad quinasa de p38 en las células T CD4⁺ de ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Las células se mantuvieron sin activación o se incubaron con anti-CD3 (1 µg/ml) + anti-CD28 (1 µg/ml) durante 15 minutos. Se observa una menor actividad de p38 (determinada por la menor fosforilación del sustrato ATF2) en las células deficientes en Gadd45b respecto a las células T CD4⁺ del ratón wt. Wb representativo de 2 experimentos.

2.2.3. p38α es un regulador negativo de proliferación y un modulador positivo de apoptosis en células T CD4⁺ en respuesta a la estimulación del TCR

Como ya se ha mostrado en el apartado anterior, Gadd45b es capaz de activar la ruta de p38, a través de MEKK4, crítica en la regulación de la respuesta inmunológica. El estudio del papel de p38 en la función de las células T se ha realizado usando inhibidores químicos, cuya principal limitación es que no son totalmente específicos, o con ratones que expresan versiones mutantes de p38 o alguna de sus quinasas activadoras (Farley y col., 2006; Godl y col., 2003; Hall-Jackson y col., 1999; Merritt y col., 2000; Rincon y col., 1998), pero nunca con un ratón deficiente debido a la letalidad embrionaria de la ausencia de p38α. Además, la gran mayoría de estos estudios se han centrado en p38α o bien no han diferenciado el papel de las dos isoformas p38α y p38β.

En el presente estudio se utiliza, por primera vez para el estudio de las células T, un modelo murino condicional deficiente en p38α (p38α^{lox/lox}), proporcionado por el laboratorio del Dr. Angel

Nebreda combinado con el modelo deficiente constitutivo de p38 β (p38 $\beta^{-/-}$), proporcionado por el laboratorio del Dr. Simon Arthur, con el fin de diferenciar los papeles de ambas isoformas en la función de las células T CD4 $^{+}$. Ambos modelos se cruzaron para obtener ratones deficientes en ambas isoformas de p38 (p38 $\alpha^{lox/lox}$ p38 $\beta^{-/-}$). Para inducir la delección de p38 α , los ratones se trataron con OHT y esta se comprobó mediante wb a partir de células de sangre periférica (datos no mostrados). En los experimentos posteriores, únicamente, se utilizaron los ratones en los que se había comprobado la ausencia p38 α .

Posteriormente, se confirmó por wb la eliminación de p38 α en distintos órganos linfoides y las células T CD4 $^{+}$. Como se observa en la figura R12, en el modelo condicional de p38 α se elimina totalmente la expresión de la proteína en timo, bazo, nódulos linfoides y células T CD4 $^{+}$. Por otra parte, no se observan diferencias en la expresión de p38 α entre las células wt y las deficientes en p38 β .

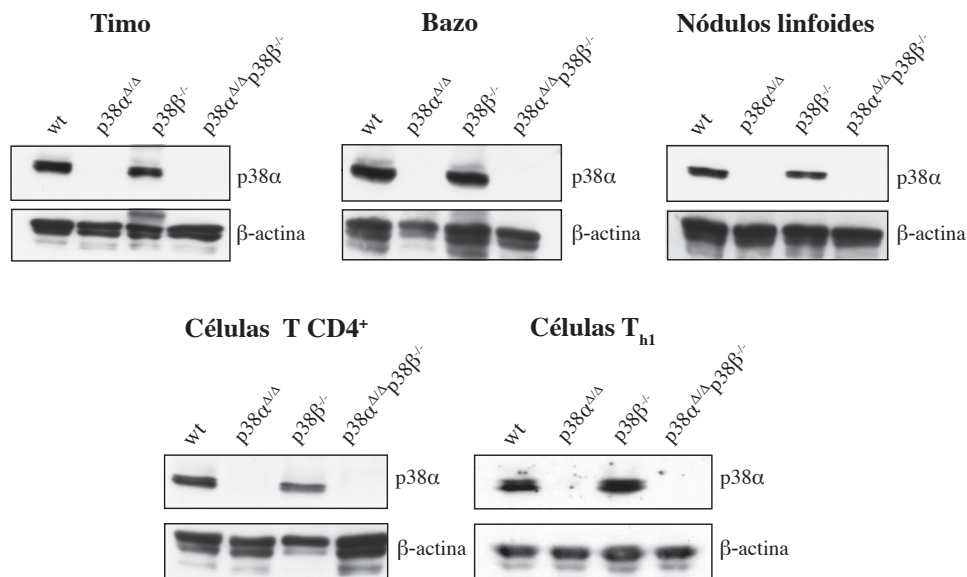


Figura R12. p38 α se elimina completamente en las células T de ratones p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ y p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$. Wb mostrando la eliminación de p38 α en células de timo, bazo, nódulos linfoides, así como en células T CD4 $^{+}$ purificadas y células diferenciadas T_{h1}. β -actina como control de carga.

A continuación, se estudió si la ausencia de p38 α y/o p38 β podría afectar a la respuesta proliferativa de las células T CD4 $^{+}$. Las células se estimularon con dosis crecientes de anti-CD3 durante 48 h y se analizó la incorporación de timidina durante las 16 h siguientes. Se observa una respuesta proliferativa ligeramente mayor en las células T CD4 $^{+}$ deficientes en p38 α y una respuesta hiperproliferativa de las células dobles deficientes p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ en comparación con la curva dosis-respuesta de las células wt, siendo más notable con las concentraciones mayores de anti-CD3 (Fig. R13A). Las células T CD4 $^{+}$ p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ incorporaron casi el doble de timidina que las células wt y en ausencia de p38 α y p38 β , las células incorporaron aún más que las p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$. Por el contrario en ausencia de únicamente p38 β las células proliferaron menos que las células wt. Cuando ambas proteínas están ausentes prevalece el efecto de la falta de p38 α .

De forma complementaria, se analizó la repuesta proliferativa mediante tinción con CFSE,

Resultados

que corroboró los resultados obtenidos con la técnica de incorporación de timidina. Las células deficientes en $p38\alpha$, así como las dobles deficientes en $p38\alpha$ y $p38\beta$ muestran un incremento en la proliferación con respecto a las células wt, mientras que las células deficientes en $p38\beta$ proliferan menos (Fig. R13B).

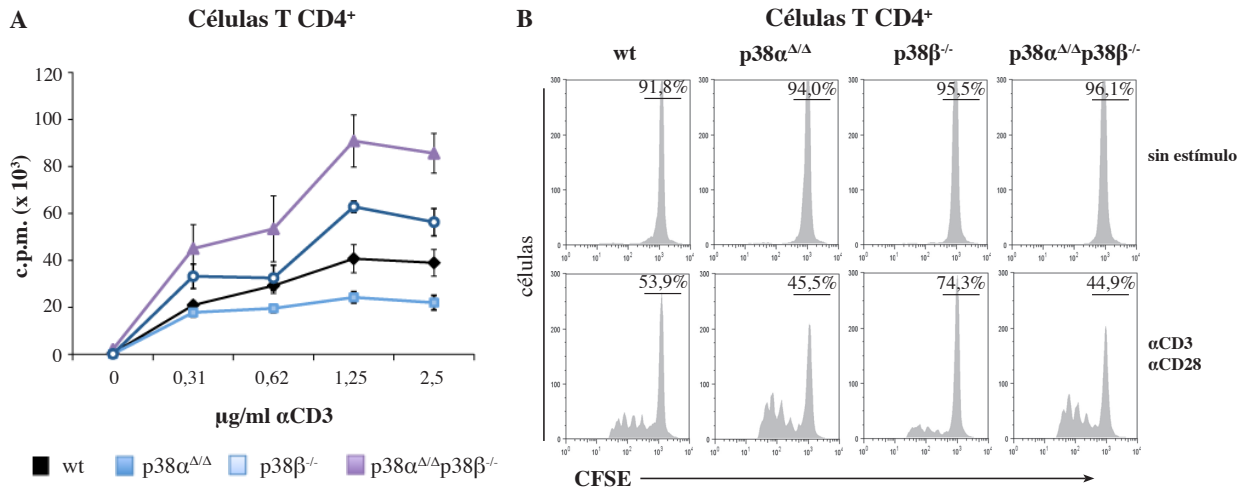


Figura R13. La proliferación de las células T CD4⁺ es dependiente de p38 α y p38 β . (A) Curva de proliferación en respuesta a distintas concentraciones de anti-CD3 ($\mu\text{g/ml}$). Se observa un aumento, medido en c.p.m., en la respuesta proliferativa de las células $p38\alpha^{\Delta\Delta}$ y $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ respecto a las células wt. Por el contrario, las células deficientes en $p38\beta$ muestran una respuesta hipo-proliferativa. Se muestra la media \pm s.em de los triplicados del siguiente número de animales: wt=9; $p38\alpha^{\Delta\Delta}$ =2; $p38\beta^{-/-}$ =6 y $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ =2. (B) Tinción con CFSE mostrando la respuesta proliferativa de las células T CD4⁺ después de 72 h sin estímulo o con una combinación de anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$) y anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$). Se representa el porcentaje de las células que no se están dividiendo, observándose una disminución de este porcentaje (mayor proliferación) en las células $p38\alpha^{\Delta\Delta}$ y $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ respecto a las células wt. Por el contrario, las células deficientes en $p38\beta$ muestran un mayor porcentaje de células sin divisiones (menor proliferación).

Estos resultados muestran una función diferencial de $p38\alpha$ y $p38\beta$ inesperada en el control de la proliferación de las células T CD4⁺. Tras la estimulación del TCR $p38\alpha$ es un regulador negativo de proliferación, mientras que $p38\beta$ parece ejercer la función contraria inhibiendo la misma.

Por otro lado, se analizó si la ausencia de $p38\alpha$ y/o $p38\beta$ podría afectar a la apoptosis espontánea o a la inducida por activación. Las células T CD4⁺ de los ratones wt, deficientes en $p38\alpha$, $p38\beta$ y dobles deficientes se cultivaron sin estímulo durante 24 o 48 h, o bien se estimularon con anti-CD3 durante 2 días y, en una segunda estimulación, con una dosis mayor de anti-CD3 durante 24 o 48 h. Como se observa en la figura R14, en ausencia de $p38\alpha$, las células T CD4⁺ que no recibieron ningún estímulo muestran un menor porcentaje de muerte tanto a 24 ($p38\alpha^{\Delta\Delta}$ vs. wt $p=0,0002$; $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ vs. wt $p=0,0016$) como a 48 h ($p38\alpha^{\Delta\Delta}$ vs. wt $p=0,19 \times 10^{-4}$; $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ vs. wt $p=0,008$). En respuesta a la estimulación del TCR, también las células $p38\alpha^{\Delta\Delta}$ y, sobre todo, las $p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ muestran menor muerte en respuesta que las células wt después de 48 h ($p38\alpha^{\Delta\Delta}p38\beta^{-/-}$ vs. wt $p=0,0062$). Sin embargo, no se observa ninguna diferencia entre las

células wt y las deficientes en p38 β en ninguna de las condiciones ensayadas.

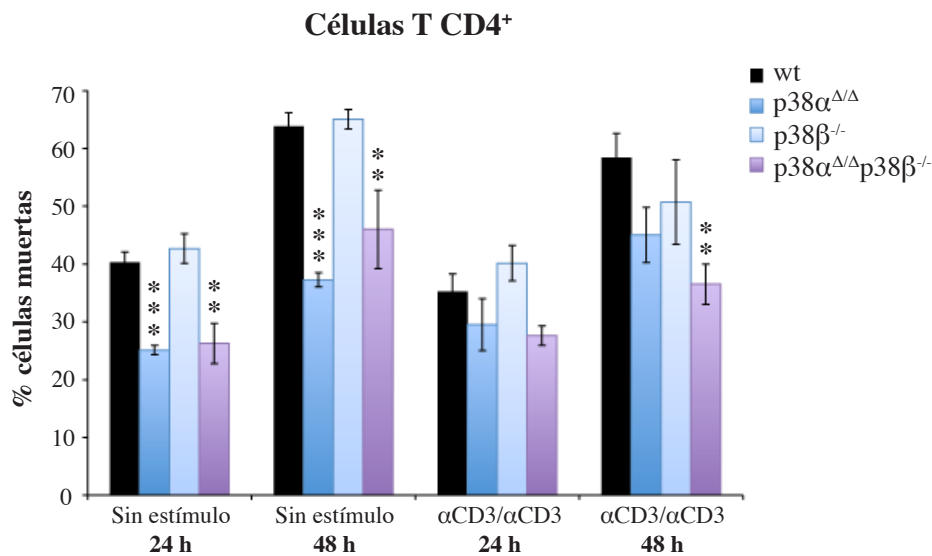


Figura R14. Estudio de la AICD en células T CD4⁺ de ratones wt, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$, p38 $\beta^{-/-}$ y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$. Porcentaje de células T CD4⁺ muertas (en fase SubG1) de ratones wt, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$, p38 $\beta^{-/-}$ y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ sin estímulo, durante 24 o 48 h, y con una combinación de estimulación primaria con anti-CD3 (5 μ g/ml), durante dos días y una secundaria, también con anti-CD3 (10 μ g/ml), durante 24 o 48 h. Se observa una disminución en el porcentaje de células muertas de ratones deficientes en p38 α (p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$) que no han recibido ningún estímulo, así como en las células dobles deficientes después de 48 h de estimulación secundaria. Número de animales utilizados en este estudio: wt=10, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =4, p38 $\beta^{-/-}$ =6 y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =5. Se muestra la media \pm s.e.m. (** p <0.01 y *** p <0.001).

El proceso de AICD implica la expresión en membrana del receptor Fas, una de las vías más importantes de inducción de apoptosis y con un papel crítico en el mantenimiento del número de células T en la periferia (Romagnani, 2006). La apoptosis se produce como consecuencia de la interacción entre Fas y FasL. El mecanismo molecular de la muerte mediada por FasL aún no está del todo definido, no está claro si Gadd45b o p38 α y/o p38 β están implicados en este proceso. Para analizar el papel de estas proteínas en la apoptosis mediada por FasL se incubaron células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b, así como células deficientes en p38 α , p38 β o en ambas con FasL recombinante durante 24 h. Los resultados muestran una disminución significativa de la muerte en las células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b (Fig. R15A) con respecto a las células wt (Gadd45b^{-/-}=45,8 \pm 3,6 vs. wt=61,4 \pm 1,7%; p =0,0051). Lo mismo ocurre en ausencia de p38 α (Fig. R15B), tanto las células simples como dobles deficientes son resistentes a la apoptosis inducida por FasL (wt=61,6 \pm 3,9%, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =38,6 \pm 2,7% (p =0,0029); p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =42,5 \pm 5,3% (p =0,0263)). Por el contrario, no existen diferencias entre las células wt y las deficientes en p38 β . Estos resultados indican que Gadd45b es un regulador positivo de apoptosis inducida por FasL y que p38 α , pero no p38 β , es necesario para este proceso.

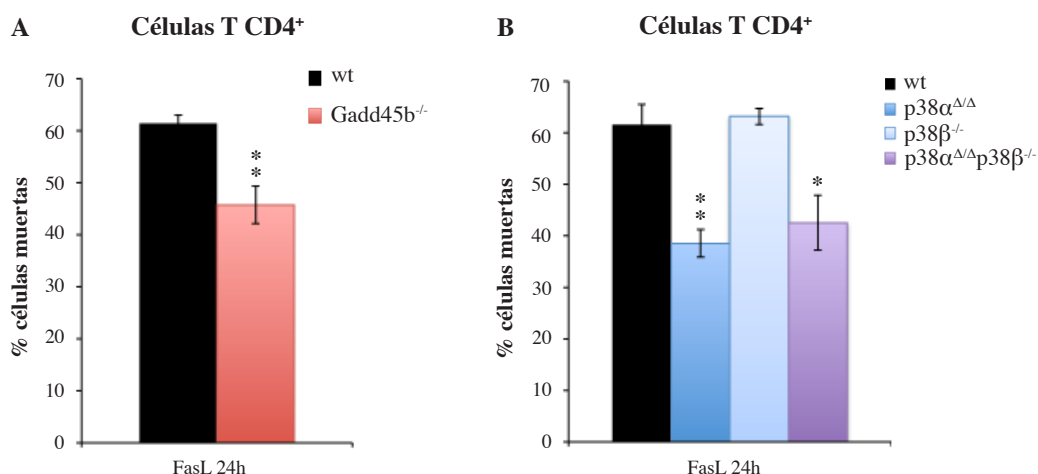


Figura R15. Análisis de la muerte inducida por FasL en células T CD4⁺. (A) Se incubaron células T CD4⁺ de ratones wt y deficientes en Gadd45b con FasL (100 ng/ml) durante 24 h. Se observa una disminución en el porcentaje de muerte en las células en las que está ausente Gadd45b. Número de animales utilizados en este estudio: wt=5 y Gadd45b^{-/-}=4. (B) Del mismo modo, se trataron células wt, deficientes en p38α, p38β o ambas isoformas. Se observa un menor porcentaje de muerte en ausencia de p38α (tanto en las células p38α^{ΔΔ} como en las p38α^{ΔΔ}p38β^{-/-}) con respecto a las células wt, sin embargo no se observa diferencia con las células deficientes en p38β. Número de animales utilizados en este estudio: wt=7, p38α^{ΔΔ}=4, p38β^{-/-}=4 y p38α^{ΔΔ}p38β^{-/-}=3. En ambos casos se representa la media ± s.e.m. (**p*<0,05 y ***p*<0,01).

Estos datos demuestran que Gadd5b y, por primera vez, p38α son necesarios en los procesos de apoptosis inducidas por FasL o por el TCR en células T CD4⁺. De manera que, en estas células, Gadd45b es un regulador positivo de la AICD, probablemente a través de la activación de p38α.

2.2.4. Gadd45b controla la producción de IFNγ inducida por estimulación del TCR en células T_{h1}

Las células T CD4⁺ son capaces de diferenciarse a células efectoras T_{h1} o T_{h2}, las cuales secretan citoquinas pro- o anti-inflamatorias, respectivamente. Las células T_{h1} producen principalmente IFNγ en respuesta a la estimulación del TCR o de la combinación de citoquinas IL12 e IL18. En cuanto a la función de Gadd45b y p38 en la regulación de estas dos vías existe una gran controversia (Lu y col., 2004; Yang y col., 2001); por ello, se utilizaron ratones deficientes en Gadd45b con el fin de examinar ambas rutas y determinar la participación de Gadd45b en la producción de IFNγ.

En primer lugar, se diferenciaron células T CD4⁺ de ratones wt y Gadd45b^{-/-} a células T_{h1}, las cuales se estimularon durante 12 h con anti-CD3 solo o en combinación con anti-CD28, así como la combinación de citoquinas IL12 e IL18. Tras analizar la cantidad de IFNγ presente en el sobrenadante de cultivos, se observó (Fig. R16) una disminución significativa en la producción de IFNγ por parte de las células procedentes de ratones Gadd45b^{-/-} cuando eran estimuladas a través del TCR, respecto a las células procedentes del ratón wt (anti-CD3: Gadd45b^{-/-}=16,8±3,3 vs. wt=34,5±4,2 ng/ml; *p*=0,006 y co-estimulación: Gadd45b^{-/-}=25,0±4,3 vs. wt=54,7±8,4 ng/ml; *p*=0,009). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas cuando se estimularon con IL12 e IL18. Estos datos indican que Gadd45b regula la producción de IFNγ sólo en respuesta a

activación del TCR.

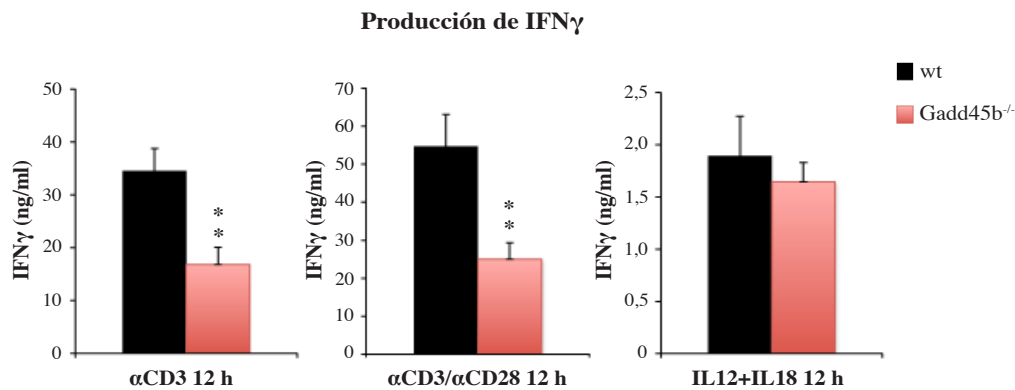


Figura R16. Producción de IFN γ por células T_{h1} diferenciadas *in vitro* de ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Las células fueron estimuladas con anti-CD3 solo (5 μ g/ml) o en combinación con anti-CD28 (5 μ g/ml) o con IL12 (3,4 ng/ml) e IL18 (10 ng/ml) durante 12 h. En ausencia de Gadd45b, las células T_{h1} producen menos IFN γ cuando son estimuladas a través del TCR (α CD3 y α CD3/ α CD28) pero no se observa ningún efecto cuando se estimulan con la combinación de citoquinas IL12 e IL18. Número de animales utilizados: wt=4; Gadd45b^{-/-}=5. Se representa la media \pm s.em. (***p*<0,01).

Para profundizar en el mecanismo molecular de la regulación de la función de las células T_{h1} por Gadd45b, se analizó la señalización de MAPKs. Se activaron células T_{h1} wt y Gadd45b^{-/-} con anti-CD3 durante diferentes tiempos (Fig. R17) y se analizó la fosforilación de ERK, p38 y JNK por wb.

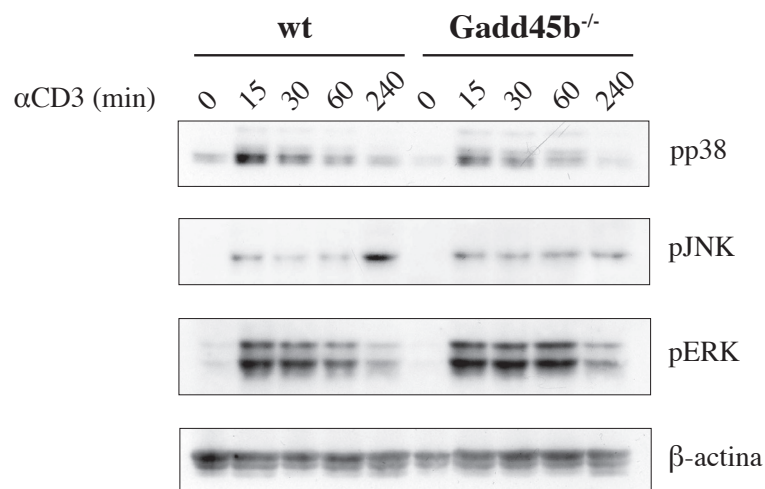


Figura R17. Estudio de la cinética de la señalización de MAPKs en células T_{h1} de ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Las células fueron diferenciadas *in vitro* y, posteriormente, estimuladas con anti-CD3 (5 μ g/ml) durante el tiempo indicado. Las células deficientes en Gadd45b muestran una menor activación inicial y un fallo en el mantenimiento de la fosforilación de p38, además de un bloqueo en la activación tardía de JNK. Por el contrario, se observa una activación normal de ERK. β -actina como control de carga. Wb representativo de 3 experimentos.

La activación de p38 es menor desde el inicio en las células T_{h1} deficientes en Gadd45b que además son incapaces de mantenerla en el tiempo. La activación tardía de JNK también está disminuida. Sin embargo, muestran una fosforilación normal de ERK. Esto indica que la regulación de la producción de IFN γ en células T_{h1} por Gadd45b puede ser mediada por p38.

Resultados

2.2.5. p38 α y p38 β regulan la producción de IFN γ inducida por estimulación del TCR pero únicamente p38 α regula la producción inducida por citoquinas en células T_{h1}

Se midió la producción de IFN γ por parte células T CD4⁺ diferenciadas a T_{h1} procedentes de ratones deficientes en p38 α , p38 β y dobles deficientes. Se diferenciaron las células a T_{h1} y se estimularon de la misma forma explicada anteriormente para los ratones deficientes en Gadd45b. En este caso, como se observa en la figura R18, cuando las células se estimulan a través de TCR disminuye la producción de IFN γ en las simples deficientes en p38 α y p38 β con respecto a las células wt; pero la disminución se hace mucho mayor en las células deficientes en ambas proteínas tanto si se estimula las células con anti-CD3 solo (wt=63,0 \pm 5,5; p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =41,1 \pm 5,4 ($p=0,0125$); p38 $\beta^{-/-}$ =32,6 \pm 4,3 ($p=0,0009$); p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =15,3 \pm 2,4 ($p=0,15 \times 10^{-8}$)) como con co-estimulación (wt=82,0 \pm 8,2; p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =54,3 \pm 6,1 ($p=0,0131$); p38 $\beta^{-/-}$ =55,4 \pm 5,9 ($p=0,0238$); p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =19,7 \pm 2,9 ($p=0,24 \times 10^{-7}$)).

Cuando se estimularon las células T_{h1} con IL12 e IL18, se observa una respuesta distinta. No hay diferencia en la producción de IFN γ entre las células T_{h1} wt y las deficientes en p38 β , sin embargo, en ausencia de p38 α , tanto en el simple como en el doble deficiente, la producción de IFN γ se ve significativamente disminuida (wt=10,9 \pm 1,7; p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =2,2 \pm 0,3 ($p=0,0001$); p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =2,7 \pm 0,8 ($p=0,0004$)).

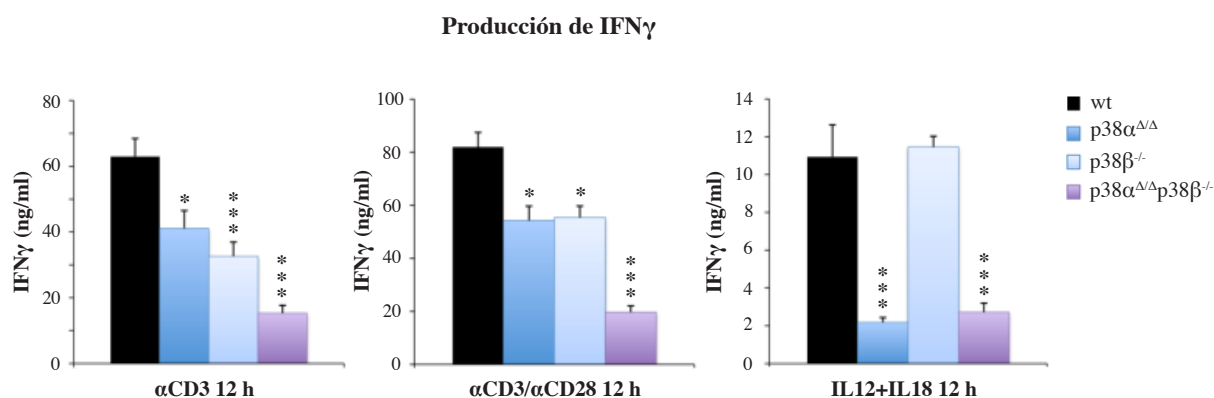


Figura R18. Producción de IFN γ por células T_{h1} diferenciadas *in vitro* de ratones wt, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$, p38 $\beta^{-/-}$ y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$. Las células se estimularon con anti-CD3 solo (5 μ g/ml) o en combinación con anti-CD28 (5 μ g/ml) o con IL12 (3,4 ng/ml) e IL18 (10 ng/ml) durante 12 h. Se observa una regulación diferencial por parte de p38 α y p38 β según el tipo de estimulación, así ambas isoformas regulan la producción inducida por estimulación del TCR, pero sólo p38 α regula cuando la estimulación es a través de citoquinas IL12 e IL18. Número de animales utilizados: wt=7, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =3, p38 $\beta^{-/-}$ =4 y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =5. Se muestra la media \pm s.em. (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$).

Estos resultados permiten diferenciar las dos vías de producción de IFN γ , por un lado, ambas isoformas (p38 α y p38 β) regulan la producción inducida por TCR y ambas son necesarias para el normal funcionamiento; pero, por otro, cuando se induce la producción a través de IL12 e IL18 la única encargada de la regulación es p38 α y en su ausencia la producción se bloquea.

2.2.6. Gadd45b, p38 α y p38 β controlan la producción de TNF α en las células T_{h1}

Otra de las citoquinas tipo T_{h1} importantes implicadas en inflamación y en supresión tumoral es TNF α . Diversos estudios han sugerido que la producción de esta citoquina está regulada por p38. Para saber si ambas o sólo una de las isoformas de p38, así como Gadd45b, están implicadas en la producción de TNF α las células T_{h1} se estimularon a través del TCR con anti-CD3 solo o en combinación con anti-CD28. En el caso de Gadd45b, los resultados muestran claramente una disminución significativa en la producción de TNF α (Fig. R19A) por las células Gadd45b^{-/-}, tanto si se estimulan las células con anti-CD3 (Gadd45b^{-/-}=0,08±0,01 vs. wt=0,14±0,03 ng/ml; $p=0,041$) como con co-estimulación (Gadd45b^{-/-}=0,16±0,01 vs. wt=0,42±0,08 ng/ml; $p=0,002$).

También se analizó la producción de IL2 (Fig. R19B), que resultó ser también menor en el caso de las células T_{h1} deficientes en Gadd45b con respecto a las células T_{h1} wt con las dos condiciones de estimulación (anti-CD3: Gadd45b^{-/-}=0,05±0,01 vs. wt=0,41±0,14; $p=0,01$ y coestimulación: Gadd45b^{-/-}=0,58±0,28 vs. wt=3,35±1,35 ng/ml; $p=0,039$).

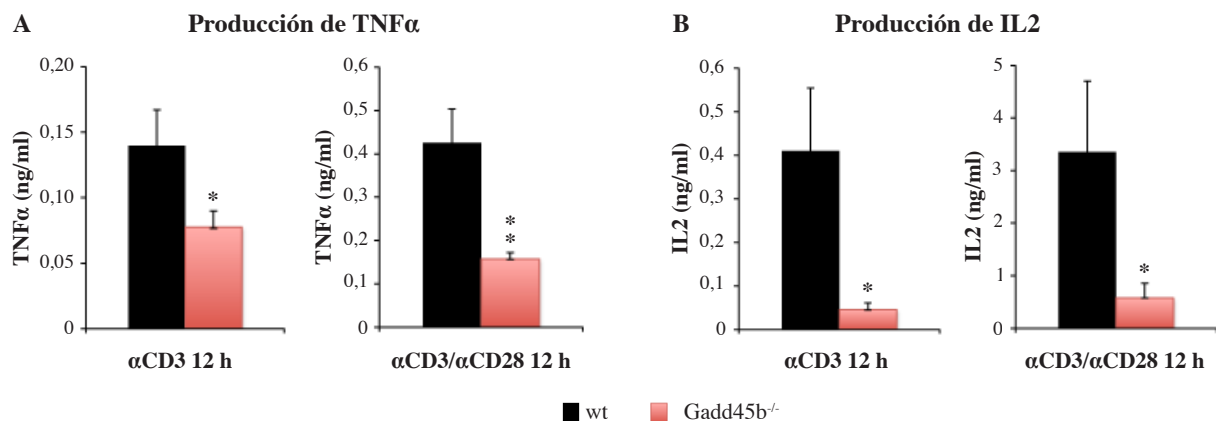


Figura R19. Medida de la producción de TNF α e IL2 en células T_{h1} diferenciadas *in vitro* de ratones wt y Gadd45b^{-/-}. Las células T_{h1} fueron estimuladas con anti-CD3 (5 μ g/ml) solo o en combinación con anti-CD28 (5 μ g/ml). Después de 12 h se analizó la producción de (A) TNF α y (B) IL2. Se observa una menor producción de ambas citoquinas por parte de las células deficientes en Gadd45b en respuesta a ambos estímulos. Número de animales utilizados: wt=4 y Gadd45b^{-/-}=5. Se representa la media±s.e.m. (* $p<0,05$ y ** $p<0,01$).

Adicionalmente, se estudió la producción de TNF α en los ratones deficientes para p38 α y p38 β . Como se observa en la figura R20, en ausencia de una de las dos isoformas no hay diferencia en la producción TNF α comparando con las células wt. Sin embargo, la ausencia de ambas isoformas (p38 α y p38 β) produce un bloqueo en la producción de TNF α (anti-CD3: p38 α^{Δ} p38 β^{Δ} =0,13±0,01 vs. wt=0,49±0,02 ($p=0,17 \times 10^{-11}$) y co-estimulación: p38 α^{Δ} p38 β^{Δ} =0,25±0,04 vs. wt=0,88±0,08 ($p=0,25 \times 10^{-6}$)).

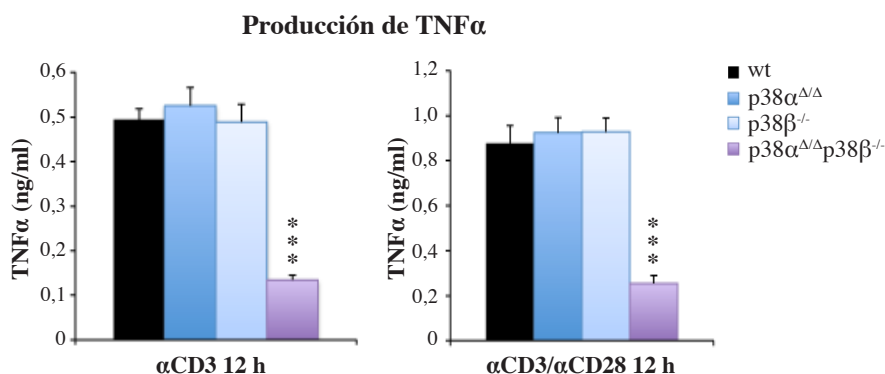


Figura R20. Medida de la producción de TNF α en células T $_{H1}$ diferenciadas *in vitro* de ratones wt, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$, p38 $\beta^{-/-}$ y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$. Las células fueron estimuladas con anti-CD3 (5 μ g/ml) solo o en combinación con anti-CD28 (5 μ g/ml) durante 12 h. Se observa una menor producción de TNF α por parte de las células dobles deficientes (p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$), mientras que los demás genotipos no presentan diferencias con respecto al wt. Número de animales utilizado: wt=7, p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ =3, p38 $\beta^{-/-}$ =4 y p38 $\alpha^{\Delta\Delta}$ p38 $\beta^{-/-}$ =5. Se representa la media \pm s.e.m. (***) p <0,001).

Estos datos demuestran que Gadd45b regula la producción de TNF α en células T $_{H1}$ estimuladas a través del TCR. Esta regulación probablemente es a través de p38 α y p38 β , que controlan de forma similar esta producción. Cuando falta una de las dos isoformas, la otra compensa la producción; sin embargo, cuando faltan las dos se produce una disminución drástica comparado con la producción de las células T $_{H1}$ wt.

2.2.7. Posible regulación por parte de Gadd45b de la producción de IL4 en células T $_{H2}$ de manera independiente de p38

Se analizó la función de Gadd45b, p38 α y p38 β en la regulación de las células T $_{H2}$ a través del estudio de producción de citoquinas IL4, IL5 e IL13. Para ello, se diferenciaron células T CD4 $^{+}$ a T $_{H2}$ y se estimularon con anti-CD3 durante 6 o 12 h. Cuando se estudiaron las células deficientes en Gadd45b (Fig. R21), no se observan diferencias significativas en la producción de IL5 o IL13 entre los distintos genotipos. Sin embargo, se observa un incremento significativo de la producción tardía de IL4 por las células Gadd45b $^{-/-}$ en comparación con las células wt (Gadd45b $^{-/-}$ =23,4 \pm 3,5 vs. wt=11,7 \pm 1,1 ng/ml; p =0,013).

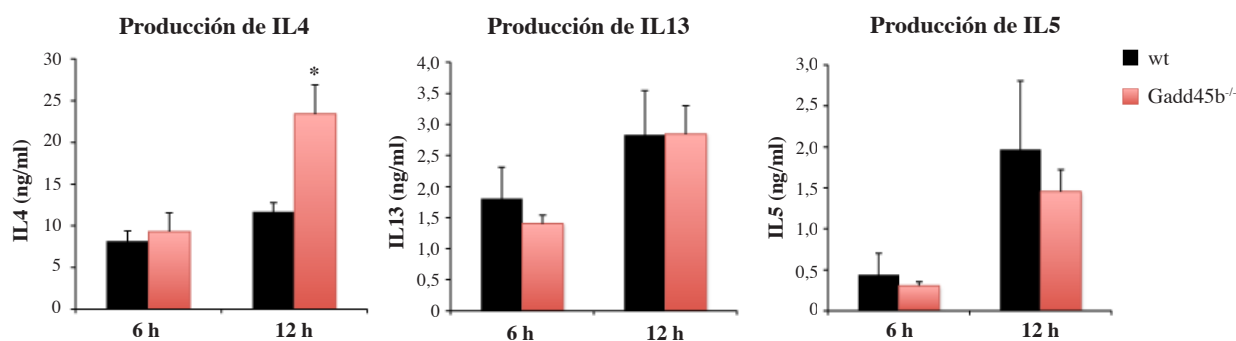


Figura R21. Producción de citoquinas (IL4, IL5 e IL13) por células T $_{H2}$ de ratones wt y Gadd45b $^{-/-}$. Las células se diferenciaron *in vitro* y, posteriormente, se estimularon con anti-CD3 (5 μ g/ml) durante 6 y 12 h. Se aprecia un incremento en la producción de IL4 a 12 h en las células Gadd45b $^{-/-}$ con respecto a las wt. No se aprecian diferencias en la producción de IL13 e IL5. Número de animales: wt=4 y Gadd45b $^{-/-}$ =5. Se representa la media \pm s.e.m. (*) p <0,05).

Por el contrario, la producción de IL4 por parte de las células $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$, $p38\beta^{-/-}$ y $p38\alpha^{\Delta/\Delta}p38\beta^{-/-}$ (Fig. R22) es similar a los niveles de las células T_{h2} wt. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la producción de IL5 o IL13 entre los distintos genotipos. Estos resultados sugieren que Gadd45b reprime la producción tardía de IL4 en células T_{h2} por una vía en la que no intervienen ni $p38\alpha$ ni $p38\beta$.

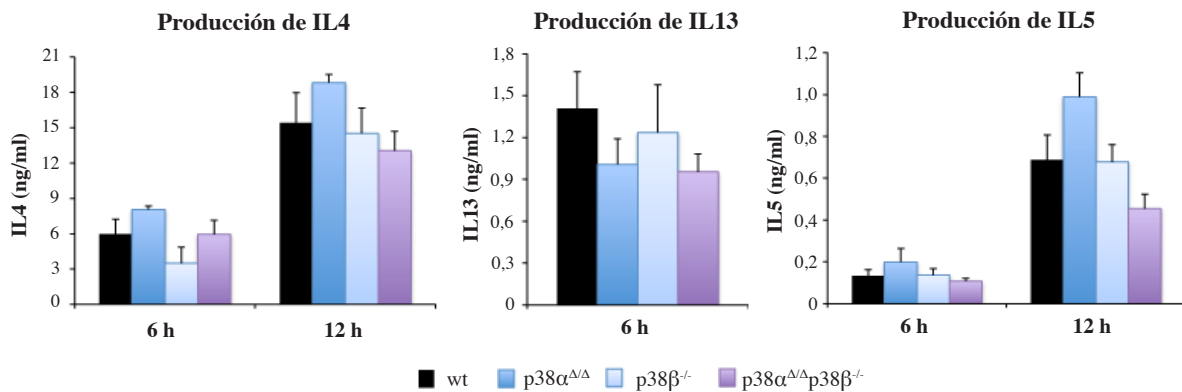


Figura R22. Producción de citoquinas (IL4, IL5 e IL13) por parte de células T_{h2} diferenciadas *in vitro* a partir de células T $CD4^+$ de ratones wt, $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$, $p38\beta^{-/-}$ y $p38\alpha^{\Delta/\Delta}p38\beta^{-/-}$. Las células fueron estimuladas con anti-CD3 (5 μ g/ml) durante 6 y 12 h (en el caso de la producción de IL13 sólo se ensayó un punto de 6 h). No se aprecian diferencias significativas en la producción de IL4, IL13 o IL5 entre los distintos genotipos y el wt. Número de animales utilizado: wt=7, $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ =3, $p38\beta^{-/-}$ =4 y $p38\alpha^{\Delta/\Delta}p38\beta^{-/-}$ =4. Se representa la media \pm s.e.m.

3. Estudio del papel de Gadd45b en el control de la tolerancia central

3.1. Hiperplasia del timo y regresión defectuosa en ratones $Gadd45b^{-/-}$

La ausencia de Gadd45b provoca un fallo en la función de los linfocitos T $CD4^+$ maduros, por lo que se quiso analizar si existe algún problema durante el desarrollo de estas células en los ratones deficientes. Los linfocitos T se desarrollan en el timo desde células inmaduras, provenientes de la médula ósea, hacia células T maduras, que migran a periferia. Se analizó el timo de ratones de diferentes edades con el fin de hacer un seguimiento del desarrollo y, posterior, regresión tímica. Así, se estudiaron ratones de 1 semana (en los que el timo aún está en proceso de formación), 1-2 meses (con el timo completamente desarrollado), 7-8 meses (el timo está en regresión) y, por último, más de 12 meses (el timo está en completa regresión). Se observó un mayor número de células en el timo de los ratones $Gadd45b^{-/-}$ en todas las edades estudiadas comparado con el timo de los ratones wt (Fig. R23), aunque esta diferencia sólo es estadísticamente significativa en los ratones de 1 semana ($Gadd45b^{-/-}$ =138,7 \pm 7,3 vs. wt=102,7 \pm 5,2 millones de células; $p=0,016$). Estos resultados indican que los ratones deficientes en Gadd45b presentan hiperplasia del timo que se mantiene con la edad.

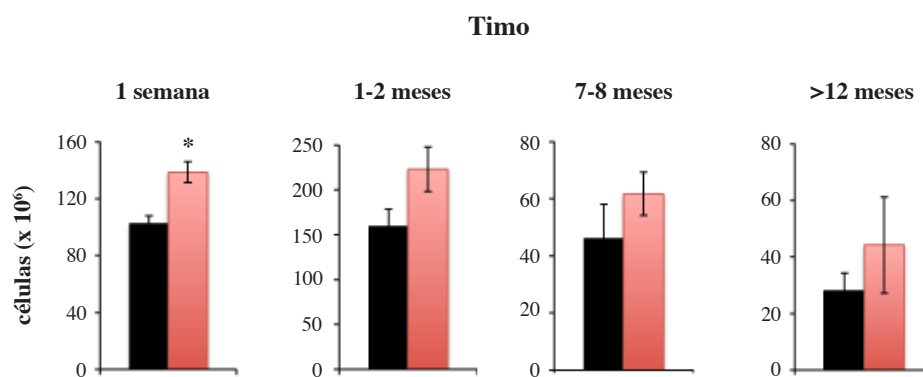


Figura R23. Número de células en el timo de ratones wt y deficientes en Gadd45b a diferentes edades.

Se observa un mayor número de células en los timos de los ratones deficientes en Gadd45b de todas las edades. Número de animales utilizado: 1 semana wt=10 y Gadd45b^{-/-}=9; 1-2 meses wt=6 y Gadd45b^{-/-}=6; 7-8 meses wt=4 y Gadd45b^{-/-}=4; >12 meses wt=4 y Gadd45b^{-/-}=4. Se representa la media±s.e.m. (**p*<0,05).

3.2. Poblaciones tímicas alteradas en ratones Gadd45b^{-/-} mayores

Para estudiar en mayor detalle el origen de las diferencias en el número de células del timo de los ratones Gadd45b con respecto a los wt, se analizaron las distintas subpoblaciones tímicas. Este estudio se llevó a cabo mediante citometría de flujo, diferenciando las células por la expresión de las moléculas de superficie CD4 y CD8. Así se distinguen por orden de madurez: las células más inmaduras dobles negativas (CD4⁻CD8⁻, DN), dobles positivas (CD4⁺CD8⁺, DP) y las células T maduras simples positivas SP CD4 (CD4⁺CD8⁻) y SP CD8 (CD4⁻CD8⁺) (Hayday y Pennington, 2007).

Como se observa en la figura R24, no se encontraron diferencias significativas en la proporción de las distintas poblaciones en los ratones más jóvenes de 1 semana y 1-2 meses. Sin embargo, en los ratones en los que el timo está en regresión (7-8 meses y más de 12 meses) se observó un aumento significativo de las poblaciones de células maduras SP CD4 (7-8 meses: Gadd45b^{-/-}=20,9±1,2 vs. wt=15,8±0,9%; *p*=0,0019 y >12 meses: Gadd45b^{-/-}=21,9±1,1 vs. wt=15,7±1,1%; *p*=0,0005) y SP CD8 (7-8 meses: Gadd45b^{-/-}=8,9±0,5 vs. wt=6,1±0,4%; *p*=0,0003 y >12 meses: Gadd45b^{-/-}=13,0±1,2 vs. wt=6,9±0,3%; *p*=0,26x10⁻⁴), así como una acumulación de células inmaduras DN (7-8 meses: Gadd45b^{-/-}=6,0±0,7 vs. wt=3,5±0,3%; *p*=0,0029 y >12 meses: Gadd45b^{-/-}=34,3±5,5 vs. wt=6,4±0,4%; *p*=0,13x10⁻⁴). Así mismo se observó una disminución en la población de células DP (7-8 meses: Gadd45b^{-/-}=63,4±2,3 vs. wt=74,8±1,5%; *p*=0,0001 y >12 meses: Gadd45b^{-/-}=29,3±6,1 vs. wt=71,4±1,4%; *p*=0,84x10⁻⁷) en los ratones Gadd45b^{-/-} mayores.

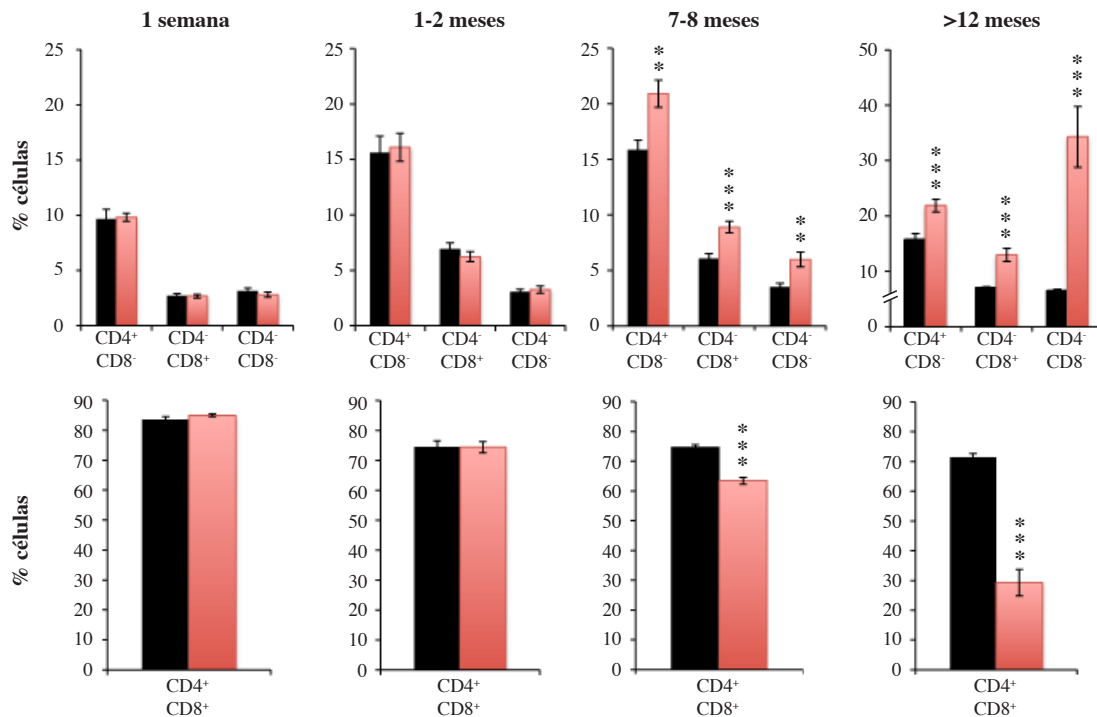


Figura R24. Porcentaje de las distintas poblaciones de células en el timo de ratones wt y Gadd45b^{-/-} a diferentes edades. No se encontraron diferencias significativas en las proporciones de células wt y Gadd45b^{-/-} de los ratones más jóvenes. Sin embargo, se observa un incremento de las células SP CD4, SP CD8 y DN en los ratones Gadd45b^{-/-} de 7-8 meses y los mayores de 12 meses. En estos mismos ratones hay una disminución de la población de DP. Número de ratones utilizado: 1 semana wt=10 y Gadd45b^{-/-}=9; 1-2 meses wt=6 y Gadd45b^{-/-}=6; 7-8 meses wt=4 y Gadd45b^{-/-}=4; >12 meses wt=4 y Gadd45b^{-/-}=4. Se representa la media±s.e.m. (**p<0,01 y ***p<0,001).

Durante la maduración de las células T en el timo existe un proceso de selección en el que se descartan las células potencialmente peligrosas y que reconocen antígenos propios (auto-reactivas), denominado selección negativa, mientras que las células tolerantes se seleccionan positivamente, continuando su desarrollo. Este proceso ocurre cuando las células están en el estadio de DP (Gill y col., 2003). Los resultados anteriores, en los que se observa una alteración en la distribución de las poblaciones tímicas, indican que podría existir un problema en el proceso de selección en el timo de los ratones deficientes en Gadd45b, coincidiendo con los signos de autoinmunidad detectados en periferia en estos ratones.

3.3. Gadd45b controla la activación de p38 y JNK implicadas en el proceso de selección tímica

Durante la selección tímica, las células reciben una señal del TCR y, según sea la intensidad de esta, son seleccionadas positiva o negativamente (Eichmann, 1995). Si la célula no recibe señal, entra en apoptosis y muere. Si la intensidad de la señal es débil la célula sigue su desarrollo hasta diferenciarse a SP CD4 o CD8. Por el contrario, si la señal es intensa, la célula es seleccionada negativamente y entra en apoptosis. En estos dos procesos de selección positiva y negativa está

Resultados

implicada la señalización por MAPK; la activación de ERK se ha asociado, principalmente, a procesos de selección positiva, mientras que la activación de p38 y JNK se ha asociado con selección negativa (Gong y col., 2001; Yun y Bevan, 2001). Sabiendo que Gadd45b regula la activación de p38 y JNK en linfocitos T, se quiso estudiar si existía un defecto en la señalización implicada en el proceso de selección tímica en los ratones deficientes en Gadd45b. Para ello, se estimularon timocitos de ratones wt y Gadd45b^{-/-} con dos dosis distintas de anti-CD3 a distintos tiempos con el fin de mimetizar los dos tipos de señales que puede recibir el timocito, por parte del TCR, durante el proceso de selección.

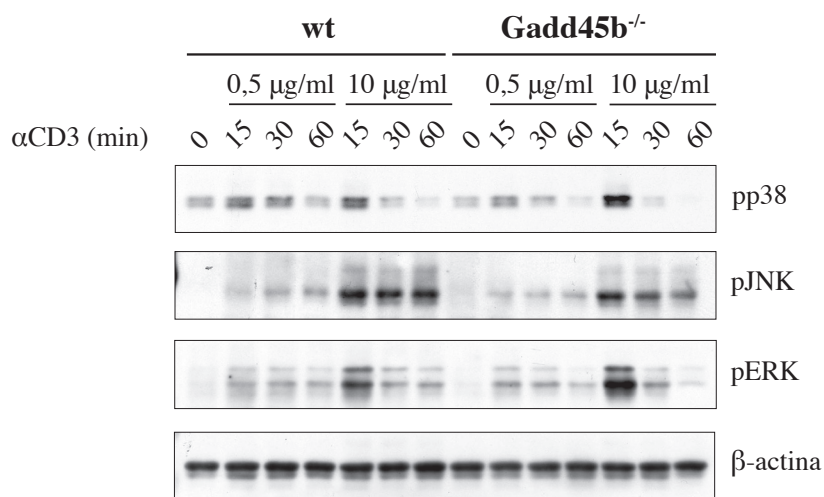


Figura R25. Señalización de MAPKs en timocitos estimulados *in vitro* con diferentes dosis de anti-CD3 a distintos tiempos. No se observan grandes diferencias en la fosforilación basal de estas proteínas ni cuando se estimulan las células con la dosis débil (0,5 μg/ml). Sin embargo, en los timocitos Gadd45b^{-/-} estimulados con la dosis fuerte (10 μg/ml) se observa un aumento inicial en la activación de las MAPKs con respecto al wt y una rápida pérdida de la fosforilación de p38 y JNK. β-actina como control de carga. Wb representativo de 3 experimentos.

El análisis de la señalización mediante wb (Fig. R25) muestra que no hay diferencias en la fosforilación basal de p38 o JNK entre ambos genotipos. La ausencia de Gadd45b no afecta sustancialmente a la cinética de activación de las MAPKs tras la estimulación débil. Por el contrario, la ausencia de Gadd45b provoca una activación de JNK atenuada a los 30 y 60 min después de una estimulación intensa. Se observa un grado similar de atenuación de la cinética de activación de p38 en las mismas condiciones. Estos datos indican que Gadd45b es necesario para el mantenimiento de la señalización de p38 y JNK tras una estimulación intensa del TCR. Por lo tanto la ausencia de Gadd45b disminuye la activación de p38 y JNK dependiente del TCR, reduciendo así la habilidad de los timocitos para sufrir la selección negativa.

3.4. Los timocitos Gadd45b^{-/-} son resistentes a la muerte inducida a través de TCR *in vivo*

Para corroborar los resultados obtenidos *in vitro* se trataron ratones wt y Gadd45b^{-/-} con anti-CD3 (100 μg) mediante inyección intraperitoneal. Esto provoca la depleción de los timocitos,

concretamente de las células DP que son las más sensibles a este estímulo. Esta inyección simula un proceso de selección negativa por inducción de apoptosis mayoritariamente en las células DP. El objetivo de este experimento era analizar por citometría de flujo las distintas poblaciones y el porcentaje de apoptosis mediante marcaje con Anexina V-FITC. Como se observa en la figura R26A, el timo de los ratones deficientes en *Gadd45b*^{-/-} de nuevo es más grande que el de los wt, incluso después de la inyección (*Gadd45b*^{-/-}=44,4±4,7 vs. wt=19±4,4 millones de células; *p*=0,006), aunque en ambos casos el porcentaje de reducción respecto al timo de los ratones inyectados con PBS es similar (89,5% en el caso de los wt y 82,5% en el caso de los *Gadd45b*^{-/-}). Sin embargo, el marcaje con Anexina V (Fig. R26B) mostró un menor porcentaje de apoptosis (muerte específica, calculada respecto al porcentaje de muerte de los controles inyectados con PBS; ver apartado 3.8 de materiales y métodos) en los timos de los ratones *Gadd45b*^{-/-} con respecto a los wt (*Gadd45b*^{-/-}=12,1±2,5 vs. wt=25,5±1,4%; *p*=0,003).

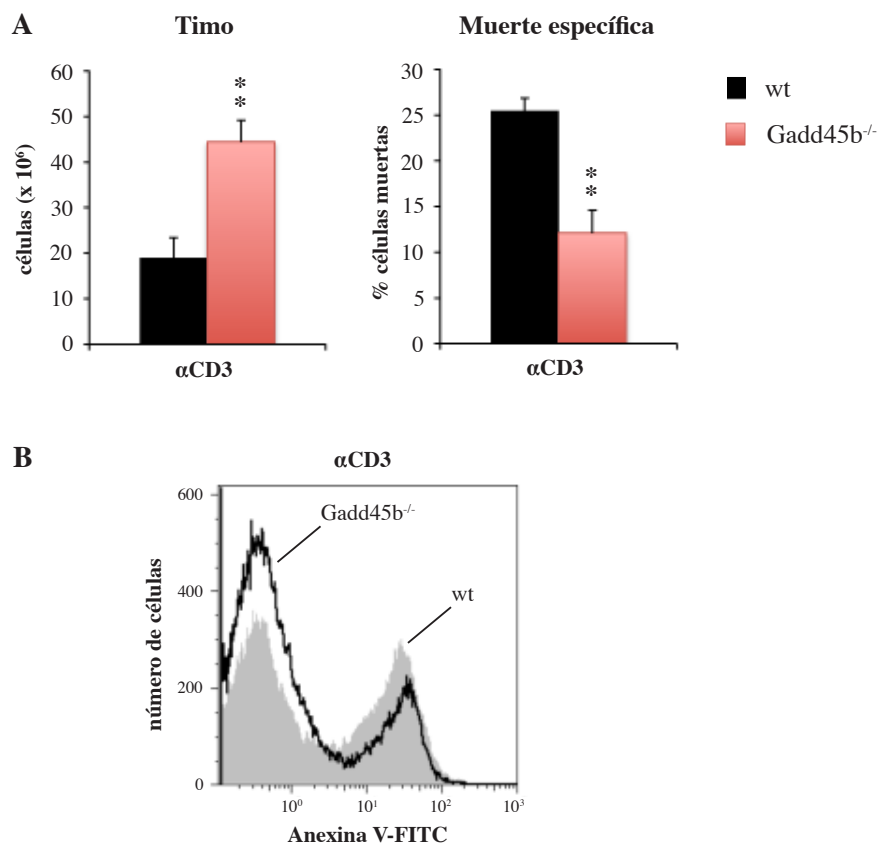


Figura R26. Los timocitos de ratones *Gadd45b*^{-/-} presentan menor porcentaje de muerte que los wt en respuesta a la inyección con anti-CD3. (A) Número de células y porcentaje de muerte específica en los timos de los ratones wt y *Gadd45b*^{-/-} 24 h después de la inyección con anti-CD3. Se representa la media±s.e.m. (n: wt anti-CD3=4; *Gadd45b*^{-/-} anti-CD3=5) (***p*<0,01). (B) Histograma representativo de tres experimentos independientes mostrando el perfil de los timocitos de ratones inyectados con anti-CD3 después de la tinción con Anexina V-FITC (wt: gris; *Gadd45b*^{-/-}: línea negra).

Al analizar las distintas poblaciones se observó que la composición del timo varía en los wt después de la inyección con anti-CD3 (Fig. R27A y B). Se reduce drásticamente la población de DP y las poblaciones mayoritarias pasan a ser las SP CD4 y CD8. La gran disminución de DP en

Resultados

los wt no se corresponde con el mismo comportamiento en los ratones deficientes. Mientras que en los wt, la población de DP tiene una drástica reducción de un 77,25% con respecto a la población inicial (de un $69,9 \pm 5,4\%$ a un $15,9 \pm 4,7\%$), en los $Gadd45b^{-/-}$ esta reducción es sólo del 32,65% (de un $75,3 \pm 3,1\%$ a un $50,7 \pm 2,9\%$) ($p=0,0003$). Como se menciona anteriormente, después de la inyección con anti-CD3, en el timo wt las poblaciones mayoritarias pasan a ser las SP CD4 y CD8 mientras que en el timo de los ratones deficientes estas poblaciones son menores con respecto al wt (SP CD4: $Gadd45b^{-/-}=30,3 \pm 1,6$ vs. wt= $53,4 \pm 5,7\%$; $p=0,0036$; SP CD8: $Gadd45b^{-/-}=13,5 \pm 1,2$ vs. wt= $23,5 \pm 3,4\%$; $p=0,0178$).

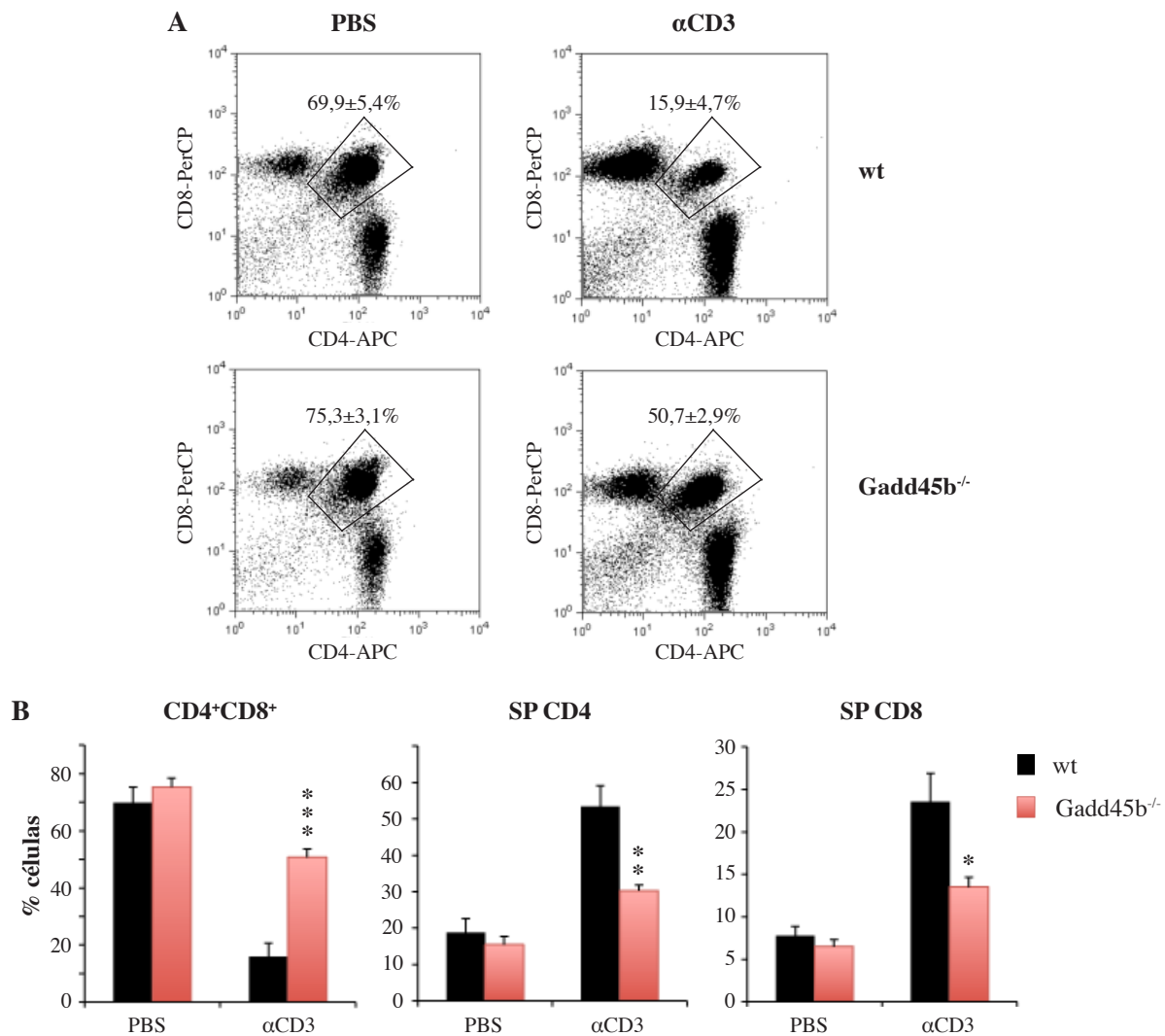


Figura R27. Porcentajes de las poblaciones de células T presentes en el timo. (A) Gráfico representativo de citometría de flujo mostrando la drástica disminución del porcentaje de las células DP 24h después de la inyección con anti-CD3 con respecto a los ratones inyectados con PBS (como control). Se observa que esta disminución es menor en el caso de los ratones deficientes en $Gadd45b$ ($***p<0,001$). (B) Porcentaje de las poblaciones DP y SP CD4 y CD8 después de la inyección con PBS o anti-CD3. Se representa la media \pm s.e.m. (n: wt PBS=5; wt anti-CD3=4; $Gadd45b^{-/-}$ PBS=4; $Gadd45b^{-/-}$ anti-CD3=5) ($*p<0,05$; $**p<0,01$ y $***p<0,001$).

La población de células DP es la más susceptible a la muerte inducida por anti-CD3, esta población se reduce en menor medida en los ratones deficientes en los que observamos menos

muerte, esto implica que existe un problema en la inducción de apoptosis en los ratones *Gadd45b*^{-/-}. Estos resultados indican una resistencia a la muerte inducida por TCR en los timocitos de ratones *Gadd45b*^{-/-}, concretamente en la población de DP en la que se lleva a cabo el proceso de selección. En conjunto, los experimentos *in vitro* e *in vivo* apuntan a que *Gadd45b* está modulando el proceso de selección negativa a través de la regulación de la apoptosis.

3.5. Fallo en la señalización de MAPK *in vivo* en los timocitos deficientes en *Gadd45b*

Se analizó la activación de MAPK *in vivo* con las células de los ratones inyectados del experimento descrito en el apartado 3.4. De este modo, se sacrificaron los ratones a las 24 h post-inyección y se analizó la señalización mediante wb en los timocitos de ratones inyectados. Como se observa en la figura R28, la activación de p38 está bloqueada en los timocitos deficientes en *Gadd45b*. Sin embargo, no se observaron diferencias en la activación de ERK. No se observa activación de JNK después de la inyección ni en timocitos wt ni deficientes en *Gadd45b*. Este resultado indica que *Gadd45b* es necesario para la activación de p38 regulando así el proceso de selección negativa en el timo.

3.6. Fallo en la apoptosis *in vivo* por vía mitocondrial en los timocitos deficientes en *Gadd45b*

Con el fin de profundizar en el papel de *Gadd45b* en apoptosis durante la selección tímica, se analizó la ruta de apoptosis en los ratones inyectados con PBS o anti-CD3 mediante wb. Por la literatura se sabe que la ruta apoptótica implicada en la selección negativa es la ruta mitocondrial o intrínseca (Bouillet y col., 2002; Bunin y col., 2005; Hubner y col., 2008; Siegel y col., 1992; Williams y col., 1998). En esta ruta participan diferentes proteínas anti- y pro-apoptóticas que se combinan e interaccionan para prevenir (Ej.: Bcl-2 y Bcl-X_L) o inducir (Ej.: Bim y Bax) la liberación del Citocromo c de la mitocondria. Cuando este se libera, forma un complejo llamado apoptosoma junto con la Caspasa-9 y Apaf-1, este complejo corta principalmente la pro-Caspasa-3 liberando la forma activa que acaba induciendo la muerte (Opferman, 2008).

Se analizaron estas proteínas en lisados celulares totales de timocitos extraídos de ratones wt y *Gadd45b*^{-/-} después de 24 h de la inyección con PBS o anti-CD3. Como se puede ver en la figura R28 no hay diferencias en la expresión de Bcl-2 o Bim. Sin embargo, se observó una mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L después de la inyección con anti-CD3 en los ratones deficientes en *Gadd45b* y una mayor expresión de la proteína pro-apoptótica Bax en estos ratones, independientemente del tipo de inyección. También se observa una menor expresión de Citocromo c en los ratones *Gadd45b*^{-/-} que se corresponde con menor corte de Caspasa-9 (no se observa disminución de la pro-forma) y de Caspasa-3. Por el contrario, no se observan cortes ni cambios en la cantidad de pro-Caspasa-8, proteína que pertenece a la ruta extrínseca.

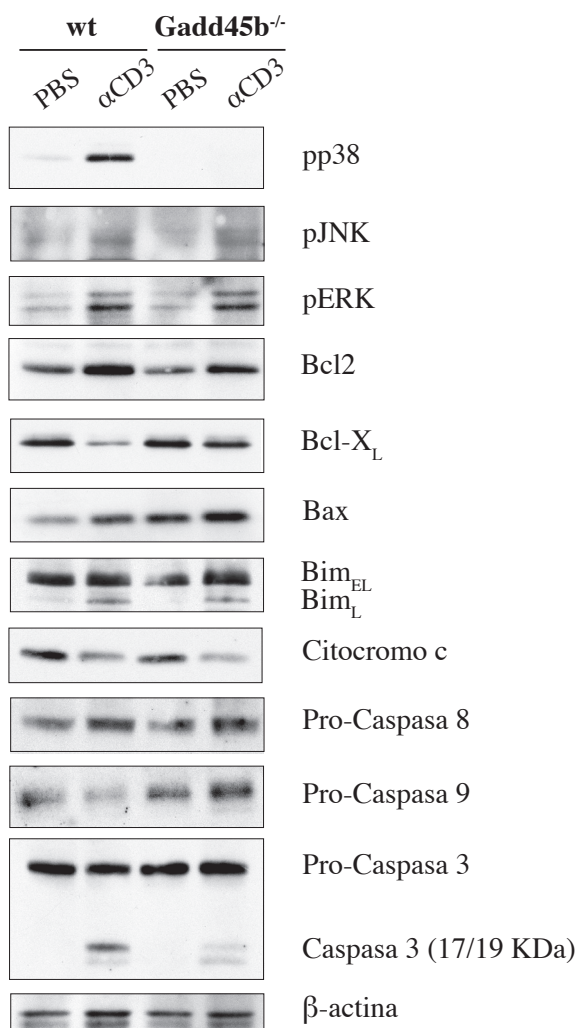


Figura R27. Análisis de la señalización de la ruta de apoptosis en el timo de ratones wt y Gadd45b^{-/-}.

Los ratones wt y Gadd45b^{-/-} fueron inyectados con PBS o anti-CD3. Tras 24 h, se analizó por wb la activación de las MAPKs, así como la expresión de diversas proteínas implicadas en la ruta apoptótica. Se observa un bloqueo de la activación de p38 en los timocitos deficientes en Gadd45b, por el contrario, no hay diferencias en la activación de ERK; no se observa activación JNK en ninguno de los dos genotipos. No hay diferencias en la expresión de Bcl-2 o Bim, pero sí de Bcl-X_L, que aparece en mayor grado en los ratones deficientes inyectados con anti-CD3, y de Bax, que aparece en mayor medida en estos ratones en los dos tipos de inyección. Se observa en los ratones deficientes inyectados con anti-CD3 menor cantidad de Citocromo c que se corresponde con un menor corte de Caspasa 3 y 9, con respecto a los ratones wt. No hay diferencias en la pro-forma de la Caspasa 8. β-actina como control de carga. El resultado es representativo de 3 experimentos independientes.

Estos resultados se correlacionan con la menor muerte observada en los timocitos de los ratones deficientes en Gadd45b después de la inyección con anti-CD3 y sugieren un fallo en la ruta apoptótica mitocondrial en estos ratones que podría estar relacionada con la regulación de las proteínas Bcl-X_L y/o Bax, probablemente, a través de p38 y Gadd45b.

En nuestro laboratorio se han cruzado ratones wt y Gadd45b^{-/-} con el modelo transgénico HY (Kisielow y col., 1988). Este modelo expresa un TCR modificado específico del antígeno HY que sólo está presente en machos, de tal manera que permite analizar el proceso de selección negativa,

analizando los machos, y de selección positiva, analizando las hembras. El análisis preliminar (datos no mostrados) muestra una alteración en la proporción de células en el timo de los machos $Gadd45b^{-/-}$ con respecto a los wt; sin embargo, no se observan alteraciones en los timos de las hembras. Esto apoya los resultados anteriores indicando que existe un defecto en la selección negativa en ausencia de $Gadd45b$.

DISCUSIÓN

1. Gadd45b y p38 controlan la tolerancia periférica

Los ratones deficientes en Gadd45b desarrollan espontáneamente una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematoso sistémico. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de anticuerpos frente a ssADN, dsADN e histonas, proteinuria y glomerulonefritis autoinmune que ocasiona la muerte prematura de los ratones debido a un fallo renal. Para determinar cómo la ausencia de Gadd45b conduce al desarrollo de esta patología autoinmune se ha analizado si tiene un papel relevante en la regulación de la tolerancia periférica y/o central.

En primer lugar, se analizó el fenotipo de ratones jóvenes que no padecen la enfermedad para buscar una relación causa efecto. Las principales alteraciones que se encontraron en los marcadores celulares son referentes a la subpoblación de células T CD4⁺. Esta población está aumentada en el bazo de los ratones deficientes en Gadd45b y muestra un fenotipo activado (mayor porcentaje de células T CD4⁺ que expresan el marcador CD25). Además, se observa el aumento de células CD44⁺ totales y la disminución de células CD62L⁺ totales. Estas alteraciones también se observan específicamente en la subpoblación de células T CD4⁺. Estos resultados indican una acumulación de células activadas y de memoria (potencialmente auto-reactivas) que podrían provocar una enfermedad autoinmune. La acumulación de células T de memoria también se observa en otros modelos murinos que desarrollan una enfermedad tipo lupus. Los ratones deficientes en p21, encargada de bloquear el ciclo celular en la transición G₁/S, muestran una acumulación de células T CD4⁺ de memoria como consecuencia de su hiperproliferación. Estos ratones, al igual que los deficientes en Gadd45b, presentan linfadenopatía, auto-anticuerpos y glomerulonefritis (Arias y col., 2007; Balomenos y col., 2000). También en los ratones portadores de la mutación *lpr* o *gld*, que expresan de forma deficiente Fas o FasL respectivamente, se observa una acumulación de células de memoria, en este caso como consecuencia del fallo en apoptosis (Giese y Davidson, 1992).

Con el fin de analizar el papel de Gadd45b en el desarrollo de la enfermedad autoinmune se realizó un estudio funcional de las células T CD4⁺. Gadd45b se induce fuertemente durante la activación de estas células, así como en las células T_{h1} y en menor medida en las T_{h2} (Lu y col., 2001), lo que sugiere un papel en la regulación de la función de las células T CD4⁺. Ante un estímulo, estas células proliferan para conseguir una respuesta adecuada. Nuestros resultados muestran que, en ausencia de Gadd45b, las células T CD4⁺ Gadd45b^{-/-} tienen una mayor proliferación que las células wt en respuesta a anti-CD3, consistente con la observación de Liu y colaboradores (Liu y col., 2005), pero también en respuesta a otros estímulos mitogénicos como ConA o IL2. La mayor diferencia se observa cuando las células se estimulan a través del TCR (anti-CD3), lo que concuerda con las características propias de células auto-reactivas que reconocen antígenos propios (a través del TCR) en las enfermedades autoinmunes. Dentro de la familia Gadd45, Gadd45b parece ser el regulador de proliferación más importante en las células T CD4⁺. En los ratones deficientes en Gadd45a, las células T CD4⁺ muestran un incremento en proliferación con respecto a las células wt, específicamente cuando son estimuladas a través del TCR (Salvador y col., 2002). Sin embargo, en

los ratones deficientes en *Gadd45g* no se observaron grandes diferencias en la proliferación de las células T CD4⁺ con respecto a las células wt (Lu y col., 2001). Nuestros resultados sugieren que en los ratones deficientes en *Gadd45b* se produce un fallo en el control del ciclo celular, puesto que la proliferación está alterada cuando se induce con diferentes estímulos. Los miembros de la familia *Gadd45* se unen a proteínas que controlan el ciclo celular (ver figura I5). De forma sinérgica, interaccionan con p21 inhibiendo la progresión del ciclo (Azam y col., 2001; Vairapandi y col., 1996), y, como se ha mencionado anteriormente los ratones deficientes en p21 desarrollan un síndrome similar al lupus, al igual que los ratones *Gadd45b*^{-/-}. También se ha comprobado que, en respuesta a estrés genotóxico, las proteínas de la familia *Gadd45* son capaces de interaccionar con el complejo Cdk1/CiclinaB1 inhibiendo la actividad quinasa y evitando la transición G₂/M (Vairapandi y col., 2002). Adicionalmente, otro punto de control sería prolongando la activación de p38 α , ya que fosforila Cdc25B lo que provoca su secuestro en el citoplasma y por tanto el bloqueo de la transición G₂/M (Bulavin y col., 2001). Aunque ninguna de estas interacciones se ha demostrado que ocurra en células T.

El papel funcional de p38 en proliferación en células T CD4⁺ no está claro. Usando los ratones deficientes en p38 α y p38 β hemos podido conocer mejor el papel de cada isoforma en la proliferación de los linfocitos T. Nuestro estudio muestra que, ante una estimulación del TCR, las células T CD4⁺ deficientes en p38 α presentan un ligero incremento en la respuesta proliferativa con respecto a las células wt. Por el contrario, las células deficientes en p38 β proliferan menos, sobre todo, con concentraciones altas de anti-CD3. Pero cuando ambas isoformas están ausentes, las células proliferan en mayor medida incluso que las simples deficientes en p38 α .

El papel de p38 en proliferación en las células T se ha estudiado por medio de diferentes herramientas, principalmente inhibidores químicos y modelos murinos. Los datos obtenidos mediante el uso de inhibidores son contradictorios. Usando el inhibidor SB203580 se observó una menor proliferación en células T murinas (Zhang y col., 1999a), en contraposición a nuestros resultados. Por el contrario, en un estudio realizado con células T humanas en el que usaban otro inhibidor de p38 (SB202190), se observó que al activar las células con anti-CD3, p38 actuaba como un regulador negativo de proliferación (Li y col., 2011). La principal limitación es que estos inhibidores han resultado no ser del todo específicos y, además, al inhibir tanto p38 α como p38 β , no permiten diferenciar el papel de ambas isoformas (Godl y col., 2003; Hall-Jackson y col., 1999).

Por otro lado, se han utilizado diferentes modelos murinos para analizar el papel de p38 en proliferación de las células T CD4⁺. Se usaron ratones quimeras RAG^{-/-}/p38 α ^{-/-} (Kim y col., 2005), estos ratones se generan inyectando células madre p38 α ^{-/-} en blastocistos RAG^{-/-}, de manera que los linfocitos maduros son deficientes en p38 α . Los esplenocitos de estos ratones resultaron no tener defectos en proliferación en respuesta a anti-CD3. En este estudio utilizaron células de bazo sin purificar, el efecto en proliferación podría estar enmascarado (similar a lo que ocurre en los ratones *Gadd45b*^{-/-}, en los cuales el efecto de la pérdida de *Gadd45b* en la proliferación de las células de nódulos linfoides sin purificar es pequeño en comparación con las células T CD4⁺ purificadas;

figura R9). Otro modelo murino utilizado expresa, en las células T, un mutante dominante negativo de p38 α bajo el promotor de *lck*. En este caso tampoco se observaron diferencias en proliferación en respuesta a ConA o anti-CD3 (Rincon y col., 1998). La limitación de este modelo es que sólo se inhibe el 40-50% de la expresión de la proteína endógena, por lo que una expresión residual podría enmascarar los resultados; además, al igual que en el modelo anterior, p38 β permanece intacta. Se han utilizado también modelos deficientes o transgénicos de las quinasas activadoras de p38: MKK3 y MKK6. En los ratones deficientes en MKK3 o MKK6 no se observaron diferencias en la proliferación de las células T CD4⁺ estimuladas con anti-CD3 (Tanaka y col., 2002). Cuando se analizó la proliferación en otro modelo que expresa una forma constitutivamente activa de la quinasa MKK6 tampoco se observaron diferencias en la proliferación de las células T CD4⁺ en respuesta a la combinación de ConA e IL2, pero no se analizó la respuesta a anti-CD3 (Merritt y col., 2000). El problema de estos modelos es que la MKK3 y la MKK6 son capaces de activar tanto a p38 α como a p38 β , por lo que tampoco permite diferenciar entre ambas isoformas. Por otro lado, ningún estudio ha analizado la función específica de p38 β en las células T CD4⁺, ya que el único trabajo hasta la fecha con un ratón deficiente se centró en la respuesta a LPS (que activa principalmente células B y macrófagos) (Beardmore y col., 2005).

La principal ventaja de nuestro modelo con respecto a las aproximaciones descritas anteriormente, es que, en este caso, se elimina completamente la expresión de ambas proteínas, p38 α y p38 β , y permite estudiar su función por separado posibilitando la asignación de funciones específicas de cada isoforma.

Estudios realizados con otros tipos celulares (cardiomiocitos, hepatocitos, fibroblastos y células de pulmón) (Bulavin y Fornace, 2004; Engel y col., 2005; Hui y col., 2007; Ventura y col., 2007; Wagner y Nebreda, 2009) muestran un incremento en la proliferación en ausencia de p38, lo que parece indicar que el papel de p38 es diferente según el tipo celular.

Nuestros resultados, en concordancia con los obtenidos con células T humanas y otros tipos celulares, indican que p38 α , en contraposición a p38 β , es un regulador negativo de proliferación y en ausencia de ambos el efecto que prevalece es el de la falta de p38 α .

Los resultados indican que Gadd45b y p38 α son reguladores negativos de la proliferación en las células T CD4⁺.

Una vez que se ha producido la respuesta inmunológica, para evitar la acumulación de células T, es necesario que esta respuesta finalice y el exceso de células que han proliferado mueran por un proceso denominado AICD. Se han descrito dos vías de señalización por las que Gadd45b puede estar regulando este proceso: por un lado, puede inducir apoptosis mediante la activación de la quinasa MEKK4 (Chi y col., 2004; Takekawa y Saito, 1998; Takekawa y col., 2002; Yoo y col., 2003) y, por otro, podría inhibir la apoptosis mediante el bloqueo de la quinasa MKK7 (Papa y col., 2004; Papa y col., 2008; Tornatore y col., 2008). En este estudio se quiso analizar el papel de Gadd45b en el proceso de AICD en células T CD4⁺. Como se observa en la figura R10 tanto sin estimulación como con diferentes activaciones (ConA, anti-CD3/anti-CD3 o anti-CD3/ConA) las

células T CD4⁺ deficientes en Gadd45b mueren menos que las células wt.

Durante el proceso de AICD se expresa una mayor cantidad de receptor Fas que recibe la señal de otras células que expresan FasL induciendo la muerte celular (Romagnani, 2006; Van Parijs y Abbas, 1998). Se indujo la muerte a través de estimulación con FasL. Dado que se observa el mismo comportamiento (las células deficientes en Gadd45b mueren menos que las del wt) se puede decir que Gadd45b está implicada en la regulación de la muerte inducida por activación vía TCR o Fas.

Estos resultados son consistentes con estudios previos (Liu y col., 2005) que señalan a Gadd45b como inductor de apoptosis en las células T. También se ha vinculado a Gadd45g como regulador de este proceso (Lu y col., 2001). Sin embargo, no se observaron defectos en AICD en los ratones deficientes en Gadd45a (Salvador y col., 2002). Existen indicios de que las proteínas de la familia forman homo- y heterodímeros (Schrag y col., 2008), por lo que es posible que Gadd45b y Gadd45g participen regulando el mismo proceso de forma similar. Aunque este aspecto no ha sido estudiado hasta el momento.

Nuestros resultados son consistentes con una menor activación de p38 y JNK en las células T CD4⁺ de los ratones Gadd45b^{-/-} en respuesta a la estimulación del TCR, como así lo confirma el análisis bioquímico, lo que sugiere que la regulación de Gadd45b durante la AICD es a través de la activación de la quinasa MEKK4 que acaba activando p38 y JNK.

El papel de JNK en apoptosis depende tanto del contexto celular como del tipo de estímulo. Los MEFs dobles deficientes en JNK1 y JNK2 estimulados a través de Fas no presentan ninguna alteración (Tournier y col., 2000). Tampoco se observa alteración alguna en MEFs dobles deficientes en MKK4 y MKK7 (Tournier y col., 2001). Cuando se estimulan células de bazo de ratones JNK1^{-/-} con anti-CD3, sí se observa una disminución en la apoptosis, pero no en las células JNK2^{-/-} (Dong y col., 1998). Un estudio que analiza el papel de p38 y JNK en AICD sugiere que ambas proteínas son necesarias en este proceso, p38 actúa de modo temprano (después de la estimulación del TCR) induciendo la expresión de FasL y la activación de las caspasas; posteriormente, las caspasas estimulan JNK que incrementa la expresión de FasL. Por lo tanto, según este trabajo, se requiere la activación de p38 para que se active JNK, de manera que ambas regulan el proceso de AICD a diferentes tiempos (Zhang y col., 2000).

Se analizó el papel de p38 α y p38 β en AICD. Los resultados de nuestro estudio muestran que en ausencia de p38 α las células, tanto simples como dobles deficientes, mueren menos que las células wt si se les deja sin estímulo y también después de estimulación con FasL. Cuando las células se estimulan con anti-CD3 (AICD), también mueren menos aunque la diferencia es mayor en los dobles deficientes a tiempos largos. Las células deficientes en p38 β no presentan ninguna alteración durante el proceso de AICD.

Trabajos anteriores muestran que p38 α podría estar implicada en este proceso, células T CD4⁺ de ratones deficientes para la quinasa MKK3, que activa preferentemente p38 α , tienen

menor muerte en respuesta a la estimulación del TCR, con IL2 o sin estímulo (Tanaka y col., 2002). También se ha descrito menor muerte en las células T CD8⁺ de los ratones dn-p38 α en respuesta a FasL (Farley y col., 2006; Merritt y col., 2000). Similares resultados se han encontrado en cardiomiocitos deficientes en p38 α que también presentan menor muerte (Porrás y col., 2004). Nuestro estudio es el primero que muestra, usando un modelo deficiente, que p38 α está regulando positivamente la apoptosis en las células T CD4⁺.

Los resultados obtenidos demuestran que Gadd45b y p38 α regulan la AICD induciendo apoptosis en células T CD4⁺ y, en ausencia de una de las dos proteínas, se produce una disminución en la apoptosis tanto después de estimulación del TCR como con FasL. Las diferencias observadas en el tiempo de la respuesta apoptótica a anti-CD3 entre los ratones Gadd45b^{-/-} y los deficientes en p38 α puede ser debida a que el efecto más drástico en los deficientes en Gadd45b refleja la disminución en la activación de, no sólo p38, sino también de JNK.

La alteración que provoca la ausencia de Gadd45b y p38 α en la proliferación y la AICD podría derivar en la acumulación con el tiempo de células T CD4⁺ activadas y de memoria hiperreactivas y potencialmente peligrosas; de hecho esta acumulación se observa tras los estudios fenotípicos de los ratones deficientes en Gadd45b, de forma más dramática en los ratones más mayores.

Después de la estimulación, las células T CD4⁺ se diferencian a células efectoras T_{h1} o T_{h2}. Las células T_{h1} producen citoquinas pro-inflamatorias como IFN γ o TNF α y organizan la respuesta celular. Los defectos en la producción de citoquinas T_{h1} son característicos de numerosas enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide, diabetes mellitus, lupus eritematoso sistémico, etc (Dong y col., 2002). Numerosos estudios sugieren que p38 está implicada en la función de las células T_{h1}. También Gadd45b como regulador de p38 y JNK se ha vinculado a la función de estas células.

Una de las citoquinas que producen las células T_{h1} es el IFN γ . Esta citoquina típicamente pro-inflamatoria tiene entre sus funciones promover la diferenciación de las células T_{h1} y la actividad de los macrófagos, así como la maduración de las células B y posterior producción de anticuerpos IgG_{2a}. En los últimos años se han descrito funciones anti-inflamatorias de esta citoquina como la estimulación de las células T_{reg}, la inhibición de las T_{h17} y la inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis en las células T_{h1} (revisado en (Kelchtermans y col., 2008)). Existe una gran controversia en cuanto a la participación de Gadd45b y p38 en la producción de esta citoquina. Se han descrito dos vías distintas: una, es la inducida por estimulación del TCR y la otra, por estimulación con la combinación de citoquinas IL12 e IL18. En cuanto a Gadd45b, algunos autores apuntan a que solo está regulando la producción inducida por IL12 e IL18 y no la inducida por el TCR (Yang y col., 2001). Sin embargo, en otro artículo se observa una disminución en la producción independientemente del tipo de estimulación (Lu y col., 2004). Respecto a p38 α , existe la misma controversia, por una parte se dice que está solo implicada en la producción inducida por IL12 e IL18 (Berenson y col., 2006), aunque la mayoría de los estudios apuntan a

que también controla la producción inducida por TCR. Las células dn-p38 α y las tratadas con el inhibidor SB203580 producen menos IFN γ que las células control en respuesta a estimulación con ConA. Por otro lado, las células expresan un mutante constitutivamente activo de la quinasa MKK6 producen mayor cantidad de IFN γ en respuesta al mismo estímulo (Rincon y col., 1998). Un modelo publicado recientemente utiliza ratones transgénicos en los que se ha sustituido la Y323 de la p38 α y la p38 β por una P, de manera que se evita la activación de p38 a través de la ruta alternativa. Las células T de los ratones p38 α^{Y323P} , p38 β^{Y323P} y p38 $\alpha\beta^{Y323P}$ producen ligeramente menos IFN γ que las wt cuando se les estimula con anti-CD3 pero no tienen diferencias cuando se estimulan con IL12 e IL18 (Jirmanova y col., 2011; Jirmanova y col., 2009), aunque el efecto no es tan drástico como el que se observa en la figura R16. Hay que aclarar que la eliminación de esta Y323 solo afecta a la activación alternativa de p38 a través de la estimulación del TCR, mientras que la ruta clásica permanece inalterada.

En este estudio se analizó el papel de Gadd45b así como de las dos isoformas de p38 en la producción de IFN γ en células T_{hi}. Los resultados obtenidos indican claramente que Gadd45b regula la producción de esta citoquina cuando las células son estimuladas a través de TCR pero no a través de las citoquinas IL12 e IL18. También se muestra que existe una regulación diferencial por parte de p38 α y p38 β que podría explicar la controversia existente en el campo. Por un lado, cuando las células se estimulan a través del TCR las dos isoformas participan en la regulación de la producción de IFN γ de forma similar y sinérgica y cuando ambas faltan se produce un bloqueo casi total. En cambio, cuando la estimulación es a través de IL12 e IL18 sólo p38 α controla la producción de IFN γ .

Por lo tanto, Gadd45b regula la producción de IFN γ inducida por estimulación del TCR en células T_{hi} a través de p38 α y p38 β , pero sólo p38 α controla la producción inducida por IL12 e IL18, independientemente de Gadd45b. Coincidiendo con estos resultados, recientemente se ha publicado que en las células T CD4⁺ humanas la producción de IFN γ inducida por IL12 e IL18 es dependiente de p38 pero no de Gadd45b (Munk y col., 2011). La discrepancia con los trabajos anteriores, realizados en modelos murinos (Lu y col., 2004; Yang y col., 2001), que indican un papel de Gadd45b cuando se induce la producción de IFN γ a través de citoquinas, podría explicarse por la diferencia en los tiempos de activación de las células. En estos trabajos, las células se activan durante tiempos más largos. Esto podría indicar que aunque a corto plazo la ausencia de Gadd45b no afecta a la producción de esta citoquina (como indican nuestros resultados), cuando se alarga el tiempo de activación se ve el efecto en la disminución en la producción (nuestros resultados muestran una leve disminución, no significativa).

Otra de las citoquinas pro-inflamatorias típicas de las células T_{hi} es el TNF α . Esta citoquina tiene un papel dual regulando tanto la inflamación como la terminación de la respuesta. También tiene funciones anti-inflamatorias: sensibiliza a las células T activadas para entrar en apoptosis y atenúa la señalización del TCR (evita el desarrollo de células auto-reactivas), entre otras funciones. Es la primera vez que se analiza el papel de Gadd45b en la regulación de la producción

de esta citoquina. Podría tener un papel a través de la activación de p38 que sí está implicada en la regulación de TNF α . En diversos estudios se ha analizado el papel de p38 en la producción de TNF α , principalmente en macrófagos. Por un lado, se ha visto que la falta de p38 α en estas células resulta en una menor producción de esta citoquina (Kang y col., 2008). Sin embargo, en macrófagos deficientes en MKK3 no se observó ninguna alteración en la producción de TNF α (Lu y col., 1999). Se ha estudiado, recientemente, en linfocitos T y células T_{hi} procedentes de ratones KI p38 α ^{Y323P} o los p38 β ^{Y323P} en los que se observó una pequeña disminución, que se acentuaba ligeramente en las células p38 $\alpha\beta$ ^{Y323P}; aunque las diferencias son pequeñas, estos resultados ya indican un posible papel de ambas isoforma (Jirmanova y col., 2011). Por último, se estudió la producción de TNF α en los ratones deficientes en p38 β mediante inyección con LPS que induce la producción de TNF α en los macrófagos (y no células T) sin observarse ningún efecto (Beardmore y col., 2005).

En nuestro estudio se quiso analizar la producción de esta citoquina en los ratones deficientes en Gadd45b y en los deficientes en las dos isoformas de p38. Los resultados indican que Gadd45b regula la producción de TNF α en células T_{hi} activadas a través de TCR. No se observan cambios con respecto a las células wt en la producción de las células deficientes en una de las dos isoformas de p38 (p38 α o p38 β), sin embargo aparece una gran disminución cuando faltan ambas isoformas. Por lo tanto, la producción de TNF α en las células T_{hi} está controlada por Gadd45b y, de forma compensatoria, por p38 α y p38 β .

Por último, otra de las citoquinas típicas de las células T_{hi} es la IL2. Esta citoquina es importante para la proliferación de las células pero también, como ya se ha indicado antes, para la finalización de la respuesta inflamatoria mediante la AICD. Las células T de los ratones deficientes en esta citoquina o en su receptor presentan hiper-proliferación y AICD defectuosa, además estos ratones desarrollan espontáneamente autoinmunidad (Sadlack y col., 1995; Suzuki y col., 1995). Recientemente, también se ha sugerido que la IL2 es crítica durante el desarrollo y necesaria para el correcto funcionamiento de las células T_{reg} (requieren IL2 para ejercer la función supresora) (de la Rosa y col., 2004). Estudios previos con células T CD4⁺ y T_{hi} Gadd45b^{-/-} indican una menor producción de IL2 con respecto a las células wt (Liu y col., 2005), aunque no proponen ningún mecanismo que lo explique. De acuerdo con esta observación, como se muestra en la figura R19, las células T_{hi} de ratones deficientes en Gadd45b producen menos IL2 que las células wt, tanto si se estimulan con anti-CD3 como con co-estimulación. Los datos sobre el papel de JNK en la respuesta T_{hi} son contradictorios: las células T deficientes en JNK1 y JNK2 muestran una disminución en la producción, (Sabapathy y col., 2001), sin embargo, las células de ratones dn-JNK1/JNK2^{-/-} y células de ratones MKK7^{-/-} muestran un incremento en la producción de IL2 (Dong y col., 2000). Ninguno de estos estudios evaluó la producción de IL2 en células T_{hi} diferenciadas *in vitro*, por lo tanto, el papel de JNK en la producción de IL2 sigue sin estar claro. En cuanto a p38, estudios previos con células T de ratones dn-p38 α muestran una producción normal de IL2 (Rincon y col., 1998), por el contrario, un estudio realizado con células Jurkat a las que se añadió el inhibidor

SB203580 y con células Jurkat dn-MKK6 mostró una disminución en la producción (Matsuda y col., 1998). Nuestros estudios bioquímicos (Fig. R15) muestran un bloqueo en la activación de p38 y JNK en células T_{h1} de ratones deficientes en Gadd45b lo que indica un papel de ambas quinasas en la respuesta T_{h1} .

En conjunto los resultados indican que Gadd45b, a través de p38 α y p38 β y, probablemente, JNK, regula la función de las células T_{h1} .

Las células T_{h2} secretan citoquinas anti-inflamatorias, IL4 principalmente, pero también IL5 e IL13 que inducen la producción de anticuerpos por parte de las células B y la respuesta frente a parásitos. La disfunción de estas células está implicada en enfermedades como asma o alergias (Dong y col., 2002). A menudo se puede encontrar en enfermedades autoinmunes un desequilibrio en la relación T_{h1}/T_{h2} , ya que se inhiben mutuamente. En este estudio se observa un fallo en la función efectora de las células T_{h1} ; se quiso analizar si la función de las células T_{h2} también estaba afectada. Solo un trabajo anterior analiza la función de Gadd45b en células T_{h2} y solo se analizó la producción de IL4, la cual se encontraba disminuida en los ratones deficientes en Gadd45b a 24 h (Liu y col., 2005). En el presente estudio se observa un aumento de la producción de esta citoquina solo en el punto de 12 h en las células Gadd45b^{-/-} comparado con el wt, pero ninguna diferencia en la producción de IL5 e IL13.

En los ratones dn-p38 α no se observaron diferencias en la función efectora de las células T_{h2} con respecto al wt (Rincon y col., 1998). Tampoco en los ratones p38 α ^{Y323P}, p38 β ^{Y323P} y p38 $\alpha\beta$ ^{Y323P} (Jirmanova y col., 2011). Los resultados de este estudio muestran que ni p38 α ni p38 β regulan la función efectora de las células T_{h2} , ya que no se encuentran diferencias en la producción de ninguna de las citoquinas estudiadas entre los ratones deficientes y los wt. El papel de Gadd45b en la función de estas células tampoco parece relevante, simplemente se observa un pequeño aumento de la producción de IL4 independiente de p38.

El desequilibrio en la relación T_{h1}/T_{h2} que se observa en los ratones Gadd45b^{-/-} puede favorecer la desregulación de otras subpoblaciones reguladoras como las células T_{h17} (extremadamente pro-inflamatorias) y las T_{reg} , en estas últimas no se observan diferencias en porcentajes en los ratones analizados, tampoco cuando se diferencian *in vitro* (datos no mostrados) pero podrían tener algún efecto de la función represora. Sería necesario analizar la función efectora de estas dos subpoblaciones tanto en los ratones deficientes en Gadd45b como en los deficientes en p38 α y/o p38 β , ya que ambas subpoblaciones han sido implicadas en autoinmunidad.

La caracterización de los ratones deficientes en Gadd45b, así como en p38 α y p38 β , nos permite ahondar en la regulación de la función de las células T CD4⁺ e identificar papeles específicos para las dos isoformas de p38 en la proliferación, apoptosis y diferenciación de estas células. Estos resultados pueden ser de gran utilidad a la hora de generar nuevos tratamientos anti-inflamatorios.

2. Gadd45b controla el mantenimiento de la tolerancia central

Con el fin de profundizar en el origen de la autoinmunidad en los ratones deficientes en *Gadd45b* se llevó a cabo un estudio fenotípico y bioquímico de las poblaciones celulares del timo de estos ratones. Los ratones deficientes en *Gadd45b* presentan un timo con mayor número de células que los ratones wt a todas las edades estudiadas. Al analizar las distintas subpoblaciones se observa una alteración en los ratones deficientes con respecto a los porcentajes encontrados en los timos de los ratones wt, principalmente en los ratones más mayores. Estos ratones presentan mayor porcentaje de las subpoblaciones DN y SP tanto CD4 como CD8, y un menor porcentaje de la población mayoritaria de células DP. Esta alteración en la composición celular del timo podría significar un fallo en el proceso de selección tímica, que se lleva a cabo cuando las células están en el estadio de DP. Durante este proceso se eliminan las células auto-reactivas (selección negativa) y se permite el desarrollo de las células tolerantes (selección positiva).

Está descrito que la intensidad de la señal recibida por el TCR juega un papel muy importante durante la selección tímica. De tal manera que una activación intensa provoca en la célula que la recibe la entrada en apoptosis (selección negativa), mientras que una señal débil conduce a la supervivencia de la célula (selección positiva) (Eichmann, 1995). Las MAPKs tienen diferentes umbrales de activación de modo que regulan la señalización del TCR de diferentes maneras después de una señal intensa o débil (Gong y col., 2001). Por ejemplo, una señal débil activa principalmente ERK y, en menor medida p38 y JNK, concluyendo en una selección positiva. Sin embargo una señal intensa activa principalmente p38 y JNK, también ERK, provocando la selección negativa (Gong y col., 2001). Como ya se ha mencionado, *Gadd45b* regula la activación de p38 y JNK, al menos en células T de periferia. Como se observa en la figura R25, después de una estimulación intensa del TCR, los timocitos *Gadd45b*^{-/-} muestran una señalización alterada principalmente de p38 y JNK, lo que sugiere un fallo en la señalización implicada en la selección negativa.

El proceso de selección negativa se lleva a cabo a través de la inducción de apoptosis en la célula potencialmente auto-reactiva y, como ya se ha visto anteriormente, *Gadd45b* regula la apoptosis en células T CD4⁺. Para analizar más a fondo este proceso se indujo apoptosis *in vivo* mediante inyección con anti-CD3 (Shi y col., 1991; Xue y col., 2000). Los resultados muestran un mayor porcentaje de células DP en el timo de los ratones *Gadd45b*^{-/-} después de la inyección que se corresponde con un menor porcentaje de muerte. Al analizar la señalización de las MAPKs, se observa un bloqueo en la activación de p38 en los ratones deficientes. Estudios previos con timocitos de ratones *MKK6*^{-/-} y *MKK3*^{-/-} a los que se inyectó anti-CD3 ya sugieren un papel de p38, ya que muestran una disminución en la muerte en los primeros y ningún efecto en los segundos, esto es debido a que la quinasa *MKK6* es la principal reguladora de p38 en el timo, mientras que la *MKK3* lo es en células T CD4⁺ de periferia (Tanaka y col., 2002). Los datos acerca de JNK en este tipo de experimentos son contradictorios. Por un lado, ratones *JNK1*^{-/-} y *JNK2*^{-/-} inyectados con anti-CD3 sugieren un papel pro-apoptótico (Sabapathy y col., 2001) y, por otro lado, timocitos de ratones *MKK4*^{-/-} y *MKK7*^{-/-} estimulados *in vitro* no muestran ningún efecto (Sasaki y col., 2001; Swat y col., 1998). Nuestros resultados, apoyados por estudios previos, indican que el principal regulador

de la apoptosis durante la selección negativa es p38, ya que en apenas se observa activación de JNK ni en los ratones deficientes ni en los wt, mientras que p38 se encuentra totalmente bloqueada.

La ruta principal implicada en la apoptosis durante la selección negativa es la vía intrínseca o mitocondrial, controlada por las proteínas de la familia Bcl-2 que interactúan para promover o evitar la liberación del citocromo c por parte de la mitocondria (Bouillet y col., 2002; Bunin y col., 2005; Hubner y col., 2008; Siegel y col., 1992; Williams y col., 1998). Sin embargo, la ruta extrínseca mediada por Fas no parece influir (Salmena y col., 2003; Singer y Abbas, 1994). Los resultados de nuestro estudio muestran un defecto en la ruta mitocondrial en los timocitos de ratones Gadd45b^{-/-}. Existe una acumulación de las proteínas Bcl-X_L y Bax en los timocitos deficientes, una menor cantidad de Citocromo c y menor corte de la Caspasa-9 y de la Caspasa-3 que se correlaciona con la disminución en el porcentaje de células muertas.

Existen numerosas evidencias en modelos murinos que muestran la importancia de las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Marsden y Strasser, 2003). Los timocitos de ratones deficientes en Bim son resistentes a la muerte inducida en diversos modelos de selección negativa (Bouillet y col., 2002). Del mismo modo, los timocitos deficientes en Bax (y Bak, otra proteína pro-apoptótica) también muestran resistencia a la muerte inducida por anti-CD3 (Rathmell y col., 2002). Por otro lado, la sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-X_L es capaz de antagonizar la selección negativa y conferir resistencia a la muerte inducida por anti-CD3 (Bouillet y col., 2002; Chao y col., 1995; Strasser y col., 1994). Estas proteínas se unen formando heterodímeros, antagonizándose, de manera que la proporción entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas determinará la respuesta de la célula (Bunin y col., 2005; Chao y col., 1995). En los ratones deficientes en Gadd45b se observa una alteración en la proporción de estas proteínas con respecto al wt que se correlaciona con la diferencia en la respuesta ante la inyección de anti-CD3.

El modo en el que Gadd45b regula esta vía de apoptosis podría ser a través de la activación de p38. Se ha visto en células B que p38 es capaz de translocarse a la mitocondria, evento que termina con la liberación de Citocromo c (Torcia y col., 2001). También se ha visto, en timocitos *in vitro*, que p38 está implicado en la translocación de Bax a la mitocondria, permitiendo la liberación del Citocromo c y, por tanto, la apoptosis (Yoshino y col., 2001). El bloqueo de la activación de p38 que se produce en ausencia de Gadd45b podría provocar la acumulación de Bax en el citosol, de manera que al no translocarse a la mitocondria no induciría la liberación de Citocromo c. p38 también puede fosforilar Bcl-X_L lo que provoca su degradación por parte del proteasoma y, por tanto, evita su función anti-apoptótica (Grethe y col., 2004). Las células DP presentan una alta expresión de Bcl-X_L que disminuye tras la señalización del TCR permitiendo la apoptosis (Chao y Korsmeyer, 1997). Esto ocurre en los timocitos del ratón wt tras la inyección con anti-CD3 pero no ocurre en el caso de los deficientes en Gadd45b. El bloqueo de la activación de p38 que se produce en ausencia de Gadd45b podría conducir a la acumulación de Bcl-X_L, que no es degradado, permitiendo que continúe ejerciendo su función anti-apoptótica. p38 también es capaz de fosforilar Bcl-2, lo que provoca la inhibición de su actividad anti-apoptótica (De Chiara y

col., 2006; Torcia y col., 2001). Estas dos proteínas anti-apoptóticas tienen patrones de expresión distintos en los linfocitos T en desarrollo; Bcl-X_L se expresa en mayor medida en las células DP que Bcl-2, el cual tiene una mayor expresión en las células DN y SP, sugiriendo que el principal regulador de la apoptosis que ocurre durante la selección negativa es Bcl-X_L (Grillot y col., 1995; Zhang y col., 2005b).

Estudios previos con modelos transgénicos de selección tímica, apoyando nuestras observaciones, muestran un aumento de la expresión de Gadd45b solo durante el proceso de selección negativa (Baldwin y Hogquist, 2007; DeRyckere y col., 2003; Schmitz y col., 2003). Los resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio con el modelo transgénico HY (Kisielow y col., 1988) indican una alteración de los porcentajes de las subpoblaciones tímicas sólo en los machos Gadd45b^{-/-} comparando con los wt, de nuevo apoyando el papel de Gadd45b en selección negativa.

En resumen, Gadd45b regula el proceso de selección negativa en el timo induciendo apoptosis a través de la regulación de la ruta mitocondrial. Esta regulación probablemente se realiza a través de la interacción entre Gadd45b y MEKK4 que conduce a la activación de p38 y posterior interacción entre p38 y Bax y/o p38 y Bcl-X_L. La desregulación de esta ruta produce un descenso en la apoptosis y, por tanto, un fallo en la selección negativa que podría derivar en la liberación de células auto-reactivas. Estas células deberían ser eliminadas una vez que salgan del timo a través de los mecanismos que controlan la tolerancia periférica. En el caso de los ratones deficientes en Gadd45b este mecanismo también es defectuoso, lo que facilitaría la supervivencia y acumulación de células potencialmente peligrosas que predisponen al desarrollo de una enfermedad autoinmune. Este trabajo demuestra que Gadd45b a través de la regulación de p38, principalmente, pero también de JNK, es indispensable para el correcto funcionamiento de los mecanismos que mantienen la tolerancia periférica y central que aseguran un estricto sistema de control y autorregulación del sistema inmunológico.

CONCLUSIONES

1. Gadd45b, p38 α y p38 β son críticos en la regulación de la función de las células T CD4⁺ y en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

- 1.1. La deficiencia de Gadd45b conduce al desarrollo espontáneo de una enfermedad autoinmune similar al lupus eritematosos sistémico.
- 1.2. Gadd45b, p38 α y p38 β son esenciales para la correcta activación de la célula T CD4⁺ a través del TCR, siendo necesario Gadd45b para la activación de p38. En respuesta a la estimulación del TCR, Gadd45b y p38 α son reguladores negativos de la proliferación, mientras que p38 β es un modulador positivo de la proliferación.
- 1.3. Gadd45b y p38 α controlan la AICD, siendo inductores de apoptosis mediada por el TCR o FasL.
- 1.4. Gadd45b, p38 α y p38 β son esenciales para la función efectora de las células T_{H1}, regulando la producción de IFN γ y TNF α inducida por el TCR. Por otro lado, únicamente p38 α controla la producción de IFN γ en respuesta a la estimulación con citoquinas.

2. Gadd45b es esencial para el normal desarrollo de las células T en el timo y el mantenimiento de la tolerancia central.

- 2.1. Los timocitos de ratones deficientes en Gadd45b muestran un fallo en la activación de p38 en respuesta a la estimulación del TCR *in vitro* e *in vivo*.
- 2.2. Gadd45b es un regulador positivo de la apoptosis inducida por estimulación del TCR en timocitos y en su ausencia se produce un fallo en la ruta de apoptosis intrínseca y, por tanto, en el proceso de selección negativa.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., y Pillai, S. (2010). Cellular and molecular immunology, 6th edn (Philadelphia, Elsevier).

Abdollahi, A., Lord, K.A., Hoffman-Liebermann, B., y Liebermann, D.A. (1991). Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 6, 165-167.

Adams, R.H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., y Nebreda, A.R. (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* 6, 109-116.

Allen, M., Svensson, L., Roach, M., Hambor, J., McNeish, J., y Gabel, C.A. (2000). Deficiency of the stress kinase p38alpha results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficient embryonic stem cells. *J Exp Med* 191, 859-870.

Aouadi, M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y., y Bost, F. (2006). Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88, 1091-1098.

Appleman, L.J., y Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192, 161-180.

Arias, C.F., Ballesteros-Tato, A., Garcia, M.I., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Martinez, A.C., y Balomenos, D. (2007). p21CIP1/WAF1 controls proliferation of activated/memory T cells and affects homeostasis and memory T cell responses. *J Immunol* 178, 2296-2306.

Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V., y Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166, 3837-3845.

Ashton-Rickardt, P.G., Bandeira, A., Delaney, J.R., Van Kaer, L., Pircher, H.P., Zinkernagel, R.M., y Tonegawa, S. (1994). Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76, 651-663.

Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.

Azam, N., Vairapandi, M., Zhang, W., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (2001). Interaction of CR6 (GADD45gamma) with proliferating cell nuclear antigen impedes negative growth control. *J Biol Chem* 276, 2766-2774.

Badger, A.M., Bradbeer, J.N., Votta, B., Lee, J.C., Adams, J.L., y Griswold, D.E. (1996). Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 1453-1461.

Baldwin, T.A., y Hogquist, K.A. (2007). Transcriptional analysis of clonal deletion in vivo. *J Immunol* 179, 837-844.

Balomenos, D., Martin-Caballero, J., Garcia, M.I., Prieto, I., Flores, J.M., Serrano, M., y Martinez, A.C. (2000). The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nat Med* 6, 171-176.

Bibliografía

Barrat, F., Haegel, H., Louise, A., Vincent-Naulleau, S., Boulouis, H.J., Neway, T., Ceredig, R., y Pilet, C. (1995). Quantitative and qualitative changes in CD44 and MEL-14 expression by T cells in C57BL/6 mice during aging. *Res Immunol* 146, 23-34.

Beadling, C., Johnson, K.W., y Smith, K.A. (1993). Isolation of interleukin 2-induced immediate-early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2719-2723.

Beardmore, V.A., Hinton, H.J., Eftychi, C., Apostolaki, M., Armaka, M., Darragh, J., McIlrath, J., Carr, J.M., Armit, L.J., Clacher, C., y col. (2005). Generation and characterization of p38beta (MAPK11) gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* 25, 10454-10464.

Behrens, A., Sabapathy, K., Graef, I., Cleary, M., Crabtree, G.R., y Wagner, E.F. (2001). Jun N-terminal kinase 2 modulates thymocyte apoptosis and T cell activation through c-Jun and nuclear factor of activated T cell (NF-AT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1769-1774.

Bellon, S., Fitzgibbon, M.J., Fox, T., Hsiao, H.M., y Wilson, K.P. (1999). The structure of phosphorylated p38gamma is monomeric and reveals a conserved activation-loop conformation. *Structure* 7, 1057-1065.

Berenson, L.S., Yang, J., Sleckman, B.P., Murphy, T.L., y Murphy, K.M. (2006). Selective requirement of p38alpha MAPK in cytokine-dependent, but not antigen receptor-dependent, Th1 responses. *J Immunol* 176, 4616-4621.

Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., y Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.

Bulavin, D.V., y Fornace, A.J., Jr. (2004). p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res* 92, 95-118.

Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Popoff, I.J., Gaarde, W.A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., y Fornace, A.J., Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411, 102-107.

Bunin, A., Khwaja, F.W., y Kersh, G.J. (2005). Regulation of Bim by TCR signals in CD4/CD8 double-positive thymocytes. *J Immunol* 175, 1532-1539.

Cameron, J.S. (1999). Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 10, 413-424.

Carrier, F., Georgel, P.T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y., y col. (1999). Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 19, 1673-1685.

Carrier, F., Smith, M.L., Bae, I., Kilpatrick, K.E., Lansing, T.J., Chen, C.Y., Engelstein, M., Friend, S.H., Henner, W.D., Gilmer, T.M., y col. (1994). Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *J Biol Chem* 269, 32672-32677.

Ceredig, R., y Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2, 888-897.

Chao, D.T., y Korsmeyer, S.J. (1997). BCL-XL-regulated apoptosis in T cell development. *Int Immunol* 9, 1375-1384.

- Chao, D.T., Linette, G.P., Boise, L.H., White, L.S., Thompson, C.B., y Korsmeyer, S.J. (1995). Bcl-XL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J Exp Med* 182, 821-828.
- Chi, H., Lu, B., Takekawa, M., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (2004). GADD45beta/GADD45gamma and MEKK4 comprise a genetic pathway mediating STAT4-independent IFNgamma production in T cells. *Embo J* 23, 1576-1586.
- Cho, H.J., Park, S.M., Hwang, E.M., Baek, K.E., Kim, I.K., Nam, I.K., Im, M.J., Park, S.H., Bae, S., Park, J.Y., y col. (2010). Gadd45b mediates Fas-induced apoptosis by enhancing the interaction between p38 and retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 285, 25500-25505.
- Cohen, P. (2009). Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* 21, 317-324.
- Cook, R., Wu, C.C., Kang, Y.J., y Han, J. (2007). The role of the p38 pathway in adaptive immunity. *Cell Mol Immunol* 4, 253-259.
- Cools, N., Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V.F., y Berneman, Z.N. (2007). Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007, 89195.
- Cuadrado, A., y Nebreda, A.R. (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429, 403-417.
- Davidson, W.F., Haudenschild, C., Kwon, J., y Williams, M.S. (2002). T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. *J Immunol* 169, 6218-6230.
- Davis, M.M., Krogsgaard, M., Huppa, J.B., Sumen, C., Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Wu, L.C., y Ehrlich, L. (2003). Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition. *Annu Rev Biochem* 72, 717-742.
- De Chiara, G., Marcocci, M.E., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., Bonini, P., Higashimoto, Y., Damonte, G., Armirotti, A., Amodei, S., y col. (2006). Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem* 281, 21353-21361.
- de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H., y Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34, 2480-2488.
- De Smaele, E., Zazzeroni, F., Papa, S., Nguyen, D.U., Jin, R., Jones, J., Cong, R., y Franzoso, G. (2001). Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature* 414, 308-313.
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682-685.
- DeRyckere, D., Mann, D.L., y DeGregori, J. (2003). Characterization of transcriptional regulation during negative selection in vivo. *J Immunol* 171, 802-811.
- Diskin, R., Lebendiker, M., Engelberg, D., y Livnah, O. (2007). Structures of p38alpha active mutants reveal conformational changes in L16 loop that induce autophosphorylation and activation. *J Mol Biol* 365, 66-76.

Bibliografía

- Dong, C., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (2002). MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol* 20, 55-72.
- Dong, C., Yang, D.D., Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Xu, J., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (2000). JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* 405, 91-94.
- Dong, C., Yang, D.D., Wysk, M., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (1998). Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 282, 2092-2095.
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., y Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16, 201-223.
- Eichmann, K. (1995). A signal strength hypothesis of thymic selection: preliminary considerations. *Immunol Lett* 44, 87-90.
- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., y Keating, M.T. (2005). p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19, 1175-1187.
- Farley, N., Pedraza-Alva, G., Serrano-Gomez, D., Nagaleekar, V., Aronshtam, A., Krahl, T., Thornton, T., y Rincon, M. (2006). p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells. *Mol Cell Biol* 26, 2118-2129.
- Fornace, A.J., Jr., Nebert, D.W., Hollander, M.C., Luethy, J.D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J., y Holbrook, N.J. (1989). Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol* 9, 4196-4203.
- Giese, T., y Davidson, W.F. (1992). Evidence for early onset, polyclonal activation of T cell subsets in mice homozygous for *lpr*. *J Immunol* 149, 3097-3106.
- Gill, J., Malin, M., Sutherland, J., Gray, D., Hollander, G., y Boyd, R. (2003). Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev* 195, 28-50.
- Ginaldi, L., De Martinis, M., Monti, D., y Franceschi, C. (2004). The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis. *Immunol Res* 30, 81-94.
- Godl, K., Wissing, J., Kurtenbach, A., Habenberger, P., Blencke, S., Gutbrod, H., Salassidis, K., Stein-Gerlach, M., Missio, A., Cotten, M., y col. (2003). An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15434-15439.
- Gong, Q., Cheng, A.M., Akk, A.M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., y Chan, A.C. (2001). Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2, 29-36.
- Grethe, S., Ares, M.P., Andersson, T., y Porn-Ares, M.I. (2004). p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res* 298, 632-642.
- Grillot, D.A., Merino, R., y Nunez, G. (1995). Bcl-XL displays restricted distribution during T cell development and inhibits multiple forms of apoptosis but not clonal deletion in transgenic mice. *J Exp Med* 182, 1973-1983.

Gupta, M., Gupta, S.K., Balliet, A.G., Hollander, M.C., Fornace, A.J., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (2005). Hematopoietic cells from Gadd45a- and Gadd45b-deficient mice are sensitized to genotoxic-stress-induced apoptosis. *Oncogene* 24, 7170-7179.

Hale, K.K., Trollinger, D., Rihanek, M., y Manthey, C.L. (1999). Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 162, 4246-4252.

Hall-Jackson, C.A., Goedert, M., Hedge, P., y Cohen, P. (1999). Effect of SB 203580 on the activity of c-Raf in vitro and in vivo. *Oncogene* 18, 2047-2054.

Harkin, D.P., Bean, J.M., Miklos, D., Song, Y.H., Truong, V.B., Englert, C., Christians, F.C., Ellisen, L.W., Maheswaran, S., Oliner, J.D., y col. (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell* 97, 575-586.

Hayday, A.C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18, 975-1026.

Hayday, A.C., y Pennington, D.J. (2007). Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 8, 137-144.

Hollander, M.C., y Fornace, A.J., Jr. (2002). Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene* 21, 6228-6233.

Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., y col. (1999). Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 23, 176-184.

Horejsi, V., Zhang, W., y Schraven, B. (2004). Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 603-616.

Horwitz, D.A., Gray, J.D., Behrendsen, S.C., Kubin, M., Rengaraju, M., Ohtsuka, K., y Trinchieri, G. (1998). Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41, 838-844.

Hubner, A., Barrett, T., Flavell, R.A., y Davis, R.J. (2008). Multisite phosphorylation regulates Bim stability and apoptotic activity. *Mol Cell* 30, 415-425.

Hui, L., Bakiri, L., Mairhorfer, A., Schweifer, N., Haslinger, C., Kenner, L., Komnenovic, V., Scheuch, H., Beug, H., y Wagner, E.F. (2007). p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat Genet* 39, 741-749.

Jameson, S.C., Hogquist, K.A., y Bevan, M.J. (1995). Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13, 93-126.

Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D., y Urdahl, K.B. (1991). CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147, 2461-2466.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., y Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920-17926.

Jirmanova, L., Giardino Torchia, M.L., Sarma, N.D., Mittelstadt, P.R., y Ashwell, J.D.

Bibliografía

(2011). Lack of the T-cell-specific alternative p38 activation pathway reduces autoimmunity and inflammation. *Blood* 118, 3280-3289.

Jirmanova, L., Sarma, D.N., Jankovic, D., Mittelstadt, P.R., y Ashwell, J.D. (2009). Genetic disruption of p38alpha Tyr323 phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated p38alpha activation and impairs interferon-gamma production. *Blood* 113, 2229-2237.

Johnson, G.L., y Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.

Ju, S., Zhu, Y., Liu, L., Dai, S., Li, C., Chen, E., He, Y., Zhang, X., y Lu, B. (2009). Gadd45b and Gadd45g are important for anti-tumor immune responses. *Eur J Immunol* 39, 3010-3018.

Jung, N., Yi, Y.W., Kim, D., Shong, M., Hong, S.S., Lee, H.S., y Bae, I. (2000). Regulation of Gadd45gamma expression by C/EBP. *Eur J Biochem* 267, 6180-6187.

Kang, Y.J., Chen, J., Otsuka, M., Mols, J., Ren, S., Wang, Y., y Han, J. (2008). Macrophage deletion of p38alpha partially impairs lipopolysaccharide-induced cellular activation. *J Immunol* 180, 5075-5082.

Kelchtermans, H., Billiau, A., y Matthys, P. (2008). How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol* 29, 479-486.

Khiem, D., Cyster, J.G., Schwarz, J.J., y Black, B.L. (2008). A p38 MAPK-MEF2C pathway regulates B-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17067-17072.

Kim, J.M., White, J.M., Shaw, A.S., y Sleckman, B.P. (2005). MAPK p38 alpha is dispensable for lymphocyte development and proliferation. *J Immunol* 174, 1239-1244.

Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U.D., Steinmetz, M., y von Boehmer, H. (1988). Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333, 742-746.

Kuan, C.Y., Yang, D.D., Samanta Roy, D.R., Davis, R.J., Rakic, P., y Flavell, R.A. (1999). The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. *Neuron* 22, 667-676.

Lee, J.C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A., y Adams, J.L. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 82, 389-397.

Li, C., Beavis, P., Palfreeman, A.C., Amjadi, P., Kennedy, A., y Brennan, F.M. (2011). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is critical step for acquisition of effector function in cytokine-activated T cells, but acts as a negative regulator in T cells activated through the T-cell receptor. *Immunology* 132, 104-110.

Liblau, R.S., Singer, S.M., y McDevitt, H.O. (1995). Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38.

Liebermann, D.A., y Hoffman, B. (1998). MyD genes in negative growth control. *Oncogene* 17, 3319-3329.

Liebermann, D.A., y Hoffman, B. (2007). Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis* 39, 329-335.

- Liebermann, D.A., y Hoffman, B. (2008). Gadd45 in stress signaling. *J Mol Signal* 3, 15.
- Lindquist, J.A., y Schraven, B. (2007). Systems biology of T cell activation. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 43-61.
- Linton, P.J., y Dorshkind, K. (2004). Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5, 133-139.
- Liu, L., Tran, E., Zhao, Y., Huang, Y., Flavell, R., y Lu, B. (2005). Gadd45 beta and Gadd45 gamma are critical for regulating autoimmunity. *J Exp Med* 202, 1341-1347.
- Lopez-Santalla, M., Salvador-Bernaldez, M., Gonzalez-Alvaro, I., Castaneda, S., Ortiz, A.M., Garcia-Garcia, M.I., Kremer, L., Roncal, F., Mulero, J., Martinez, A.C., y col. (2011). Tyr(3)(2)(3)-dependent p38 activation is associated with rheumatoid arthritis and correlates with disease activity. *Arthritis Rheum* 63, 1833-1842.
- Love, P.E., y Hayes, S.M. (2010). ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002485.
- Lu, B. (2006). The molecular mechanisms that control function and death of effector CD4+ T cells. *Immunol Res* 36, 275-282.
- Lu, B., Ferrandino, A.F., y Flavell, R.A. (2004). Gadd45beta is important for perpetuating cognate and inflammatory signals in T cells. *Nat Immunol* 5, 38-44.
- Lu, B., Yu, H., Chow, C., Li, B., Zheng, W., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (2001). GADD45gamma mediates the activation of the p38 and JNK MAP kinase pathways and cytokine production in effector TH1 cells. *Immunity* 14, 583-590.
- Lu, H.T., Yang, D.D., Wysk, M., Gatti, E., Mellman, I., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (1999). Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *Embo J* 18, 1845-1857.
- Malek, T.R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 26, 453-479.
- Marsden, V.S., y Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu Rev Immunol* 21, 71-105.
- Matsuda, S., Moriguchi, T., Koyasu, S., y Nishida, E. (1998). T lymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *J Biol Chem* 273, 12378-12382.
- Merritt, C., Enslin, H., Diehl, N., Conze, D., Davis, R.J., y Rincon, M. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells. *Mol Cell Biol* 20, 936-946.
- Metz, D.P., y Bottomly, K. (1999). Function and regulation of memory CD4 T cells. *Immunol Res* 19, 127-141.
- Mittelstadt, P.R., Salvador, J.M., Fornace, A.J., Jr., y Ashwell, J.D. (2005). Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle* 4, 1189-1192.
- Mittelstadt, P.R., Yamaguchi, H., Appella, E., y Ashwell, J.D. (2009). T cell receptor-mediated activation of p38{alpha} by mono-phosphorylation of the activation loop results in

Bibliografía

altered substrate specificity. *J Biol Chem* 284, 15469-15474.

Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q., y Saito, H. (2007). Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol Cell Biol* 27, 2765-2776.

Mudgett, J.S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N.A., Yang, L., Gopal, S., y Shen, M.M. (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10454-10459.

Munk, R.B., Sugiyama, K., Ghosh, P., Sasaki, C.Y., Rezanka, L., Banerjee, K., Takahashi, H., Sen, R., y Longo, D.L. (2011). Antigen-independent IFN-gamma production by human naive CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PLoS One* 6, e18553.

Nakayama, K., Hara, T., Hibi, M., Hirano, T., y Miyajima, A. (1999). A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. *J Biol Chem* 274, 24766-24772.

Opferman, J.T. (2008). Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 15, 234-242.

Papa, S., Monti, S.M., Vitale, R.M., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., De Smaele, E., Dathan, N., Pedone, C., Ruvo, M., y col. (2007). Insights into the structural basis of the GADD45beta-mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNKK2. *J Biol Chem* 282, 19029-19041.

Papa, S., Zazzeroni, F., Bubici, C., Jayawardena, S., Alvarez, K., Matsuda, S., Nguyen, D.U., Pham, C.G., Nelsbach, A.H., Melis, T., y col. (2004). Gadd45 beta mediates the NF-kappa B suppression of JNK signalling by targeting MKK7/JNKK2. *Nat Cell Biol* 6, 146-153.

Papa, S., Zazzeroni, F., Fu, Y.X., Bubici, C., Alvarez, K., Dean, K., Christiansen, P.A., Anders, R.A., y Franzoso, G. (2008). Gadd45beta promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling. *J Clin Invest* 118, 1911-1923.

Pedraza-Alva, G., Koulunis, M., Charland, C., Thornton, T., Clements, J.L., Schlissel, M.S., y Rincon, M. (2006). Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint. *Embo J* 25, 763-773.

Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., y Nebreda, A.R. (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15, 922-933.

Raingaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Derijard, B., y Davis, R.J. (1996). MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* 16, 1247-1255.

Rathmell, J.C., Lindsten, T., Zong, W.X., Cinalli, R.M., y Thompson, C.B. (2002). Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. *Nat Immunol* 3, 932-939.

Remy, G., Risco, A.M., Inesta-Vaquera, F.A., Gonzalez-Teran, B., Sabio, G., Davis, R.J., y Cuenda, A. (2010). Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell Signal* 22, 660-667.

Rincon, M., y Davis, R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev* 228, 212-224.

Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J* 17, 2817-2829.

Rincon, M., y Pedraza-Alva, G. (2003). JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev* 192, 131-142.

Romagnani, S. (2006). Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 36, 1357-1366.

Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J.P., Jochum, W., Wagner, E.F., y Karin, M. (1999a). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr Biol* 9, 116-125.

Sabapathy, K., Jochum, W., Hochedlinger, K., Chang, L., Karin, M., y Wagner, E.F. (1999b). Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. *Mech Dev* 89, 115-124.

Sabapathy, K., Kallunki, T., David, J.P., Graef, I., Karin, M., y Wagner, E.F. (2001). c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 y JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J Exp Med* 193, 317-328.

Sadlack, B., Lohler, J., Schorle, H., Klebb, G., Haber, H., Sickel, E., Noelle, R.J., y Horak, I. (1995). Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 25, 3053-3059.

Salmena, L., Lemmers, B., Hakem, A., Matysiak-Zablocki, E., Murakami, K., Au, P.Y., Berry, D.M., Tamblyn, L., Shehabeldin, A., Migon, E., y col. (2003). Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity. *Genes Dev* 17, 883-895.

Salvador, J.M., Hollander, M.C., Nguyen, A.T., Kopp, J.B., Barisoni, L., Moore, J.K., Ashwell, J.D., y Fornace, A.J., Jr. (2002). Mice lacking the p53-effector gene Gadd45a develop a lupus-like syndrome. *Immunity* 16, 499-508.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Belova, G.I., Fornace, A.J., Jr., y Ashwell, J.D. (2005a). The autoimmune suppressor Gadd45alpha inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol* 6, 396-402.

Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., Jr., y Ashwell, J.D. (2005b). Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol* 6, 390-395.

Sanchez, R., Pantoja-Uceda, D., Prieto, J., Diercks, T., Marcaida, M.J., Montoya, G., Campos-Olivas, R., y Blanco, F.J. (2010). Solution structure of human growth arrest and DNA damage 45alpha (Gadd45alpha) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase. *J Biol Chem* 285, 22196-22201.

Sasaki, T., Wada, T., Kishimoto, H., Irie-Sasaki, J., Matsumoto, G., Goto, T., Yao, Z., Wakeham, A., Mak, T.W., Suzuki, A., y col. (2001). The stress kinase mitogen-activated protein kinase kinase (MKK)7 is a negative regulator of antigen receptor and growth factor receptor-induced proliferation in hematopoietic cells. *J Exp Med* 194, 757-768.

Bibliografía

- Schmitz, I., Clayton, L.K., y Reinherz, E.L. (2003). Gene expression analysis of thymocyte selection in vivo. *Int Immunol* 15, 1237-1248.
- Schrag, J.D., Jiralerspong, S., Banville, M., Jaramillo, M.L., y O'Connor-McCourt, M.D. (2008). The crystal structure and dimerization interface of GADD45gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6566-6571.
- Sebzda, E., Wallace, V.A., Mayer, J., Yeung, R.S., Mak, T.W., y Ohashi, P.S. (1994). Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. *Science* 263, 1615-1618.
- Sempowski, G.D., Gooding, M.E., Liao, H.X., Le, P.T., y Haynes, B.F. (2002). T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Mol Immunol* 38, 841-848.
- Shi, Y.F., Bissonnette, R.P., Parfrey, N., Szalay, M., Kubo, R.T., y Green, D.R. (1991). In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *J Immunol* 146, 3340-3346.
- Siegel, R.M., Katsumata, M., Miyashita, T., Louie, D.C., Greene, M.I., y Reed, J.C. (1992). Inhibition of thymocyte apoptosis and negative antigenic selection in bcl-2 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7003-7007.
- Singer, G.G., y Abbas, A.K. (1994). The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365-371.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., y Fornace, A.J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376-1380.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., y Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., y Jordan, M.S. (2009). T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591-619.
- Starr, T.K., Jameson, S.C., y Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21, 139-176.
- Stein, B., Yang, M.X., Young, D.B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B.W., y Barbosa, M.S. (1997). p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J Biol Chem* 272, 19509-19517.
- Strasser, A., Harris, A.W., von Boehmer, H., y Cory, S. (1994). Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1376-1380.
- Sugawara, T., Moriguchi, T., Nishida, E., y Takahama, Y. (1998). Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes. *Immunity* 9, 565-574.
- Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., Griesser, H., y col. (1995). Deregulated T cell activation and

autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268, 1472-1476.

Svensson, C.I., Inoue, T., Hammaker, D., Fukushima, A., Papa, S., Franzoso, G., Schett, G., Corr, M., Boyle, D.L., y Firestein, G.S. (2009). Gadd45beta deficiency in rheumatoid arthritis: enhanced synovitis through JNK signaling. *Arthritis Rheum* 60, 3229-3240.

Swat, W., Fujikawa, K., Ganiatsas, S., Yang, D., Xavier, R.J., Harris, N.L., Davidson, L., Ferrini, R., Davis, R.J., Labow, M.A., y col. (1998). SEK1/MKK4 is required for maintenance of a normal peripheral lymphoid compartment but not for lymphocyte development. *Immunity* 8, 625-634.

Takekawa, M., Kubota, Y., Nakamura, T., y Ichikawa, K. (2011). Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions. *Nagoya J Med Sci* 73, 1-14.

Takekawa, M., y Saito, H. (1998). A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* 95, 521-530.

Takekawa, M., Tatebayashi, K., Itoh, F., Adachi, M., Imai, K., y Saito, H. (2002). Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *Embo J* 21, 6473-6482.

Tamura, K., Sudo, T., Senfleben, U., Dadak, A.M., Johnson, R., y Karin, M. (2000). Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell* 102, 221-231.

Tanaka, N., Kamanaka, M., Enslin, H., Dong, C., Wysk, M., Davis, R.J., y Flavell, R.A. (2002). Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis. *EMBO Rep* 3, 785-791.

Taub, D.D., y Longo, D.L. (2005). Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol Rev* 205, 72-93.

Thalhamer, T., McGrath, M.A., y Harnett, M.M. (2008). MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* (Oxford) 47, 409-414.

Torcia, M., De Chiara, G., Nencioni, L., Ammendola, S., Labardi, D., Lucibello, M., Rosini, P., Marlier, L.N., Bonini, P., Dello Sbarba, P., y col. (2001). Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem* 276, 39027-39036.

Tornatore, L., Marasco, D., Dathan, N., Vitale, R.M., Benedetti, E., Papa, S., Franzoso, G., Ruvo, M., y Monti, S.M. (2008). Gadd45 beta forms a homodimeric complex that binds tightly to MKK7. *J Mol Biol* 378, 97-111.

Tournier, C., Dong, C., Turner, T.K., Jones, S.N., Flavell, R.A., y Davis, R.J. (2001). MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev* 15, 1419-1426.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., y Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.

Vairapandi, M., Balliet, A.G., Fornace, A.J., Jr., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (1996).

Bibliografía

The differentiation primary response gene MyD118, related to GADD45, encodes for a nuclear protein which interacts with PCNA and p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 12, 2579-2594.

Vairapandi, M., Balliet, A.G., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. *J Cell Physiol* 192, 327-338.

Van Parijs, L., y Abbas, A.K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.

Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., y Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet* 39, 750-758.

Wagner, E.F., y Nebreda, A.R. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9, 537-549.

Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., y Palmer, E. (2003). Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299, 1859-1863.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., y Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.

Williams, O., Norton, T., Halligey, M., Kioussis, D., y Brady, H.J. (1998). The action of Bax and bcl-2 on T cell selection. *J Exp Med* 188, 1125-1133.

Wilson, K.P., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P., y Su, M.S. (1996). Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 27696-27700.

Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R., y Karin, M. (2000). MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5243-5248.

Xue, Y., Castanos-Velez, E., Biberfeld, P., y Jondal, M. (2000). Anti-CD3 induced thymocyte apoptosis in vivo require the antibody Fc domain. *Scand J Immunol* 51, 441-446.

Yang, D.D., Conze, D., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Davis, R.J., Rincon, M., y Flavell, R.A. (1998). Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. *Immunity* 9, 575-585.

Yang, J., Zhu, H., Murphy, T.L., Ouyang, W., y Murphy, K.M. (2001). IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2, 157-164.

Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., Zhang, X., Finn, O.J., Chen, X., y Lu, B. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8(+) T cells. *Eur J Immunol* 41, 3351-3360.

Yoo, J., Ghiassi, M., Jirmanova, L., Balliet, A.G., Hoffman, B., Fornace, A.J., Jr., Liebermann, D.A., Bottinger, E.P., y Roberts, A.B. (2003). Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem* 278, 43001-43007.

Yoshino, T., Kishi, H., Nagata, T., Tsukada, K., Saito, S., y Muraguchi, A. (2001). Differential involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes. *Eur J Immunol* 31, 2702-2708.

Yu, J.J., Tripp, C.S., y Russell, J.H. (2003). Regulation and phenotype of an innate Th1 cell: role of cytokines and the p38 kinase pathway. *J Immunol* 171, 6112-6118.

Yun, T.J., y Bevan, M.J. (2001). The Goldilocks conditions applied to T cell development. *Nat Immunol* 2, 13-14.

Zazzeroni, F., Papa, S., Algeciras-Schimmich, A., Alvarez, K., Melis, T., Bubici, C., Majewski, N., Hay, N., De Smaele, E., Peter, M.E., y col. (2003). Gadd45 beta mediates the protective effects of CD40 costimulation against Fas-induced apoptosis. *Blood* 102, 3270-3279.

Zhang, J., Gao, J.X., Salojin, K., Shao, Q., Grattan, M., Meagher, C., Laird, D.W., y Delovitch, T.L. (2000). Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med* 191, 1017-1030.

Zhang, J., Salojin, K.V., Gao, J.X., Cameron, M.J., Bergerot, I., y Delovitch, T.L. (1999a). p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T cells. *J Immunol* 162, 3819-3829.

Zhang, N., Ahsan, M.H., Zhu, L., Sambucetti, L.C., Purchio, A.F., y West, D.B. (2005a). NF-kappaB and not the MAPK signaling pathway regulates GADD45beta expression during acute inflammation. *J Biol Chem* 280, 21400-21408.

Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., Draper, D., y He, Y.W. (2005b). The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res* 15, 749-769.

Zhang, W., Bae, I., Krishnaraju, K., Azam, N., Fan, W., Smith, K., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (1999b). CR6: A third member in the MyD118 and Gadd45 gene family which functions in negative growth control. *Oncogene* 18, 4899-4907.

Zhang, W., Fu, S., Liu, X., Zhao, X., Peng, W., Wu, C., Li, Y., Li, X., Bartlam, M., Zeng, Z.H., y col. (2011). Crystal structure of human Gadd45 reveals an active dimer. *Protein Cell* 2, 814-826.

Zhu, J., y Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.

Zhu, J., Yamane, H., y Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28, 445-489.